

Biofísica y Fisiología Celular



**Ramón Latorre, José López-Barneo,
Francisco Bezanilla, Rodolfo Llinás**
(eds.)

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Material protegido por derechos de autor

BIOFÍSICA Y FISIOLÓGÍA CELULAR

**Ramón Latorre, José López-Barneo,
Francisco Bezanilla, Rodolfo Llinás
(edits.)**



**UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIADO DE PUBLICACIONES
1996**

SERIE: CIENCIAS

NÚMERO: 49

Con la colaboración editorial de Francisco BEZANILLA (Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UCLA, Los Ángeles, EE.UU.) y Rodolfo LLINÁS (Departamento de Fisiología y Biofísica, New York University Medical Center, Nueva York, EE.UU.).

Reservado todos los derechos. Ni la totalidad ni parte de este libro puede reproducirse o transmitirse por ningún procedimiento electrónico o mecánico, incluyendo fotocopia, grabación magnética o cualquier almacenamiento de información y sistema de recuperación, sin permiso escrito del Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla.

© UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

Secretariado de Publicaciones, 1996

© RAMÓN LATORRE

Centro de Estudios Científicos y Facultad de Ciencias

Universidad de Chile

Santiago, Chile. 1996

© JOSÉ LÓPEZ-BARNEO

Departamento de Fisiología Médica y Biofísica

Facultad de Medicina

Universidad de Sevilla, Sevilla, España. 1996

Impreso en España-Printed in Spain

Depósito Legal: SE-367-96

I.S.B.N.: 84-472-0339-5

Imprime: Grafivalme, S.L.

Teléf.: 472 53 23 / 566 50 80

ÍNDICE GENERAL

Prólogo	VII
Sección I. Membranas Biológicas	
Cap. 1. Organización molecular de las membranas biológicas.....	3
Cap. 2. Interacciones entre lípidos y proteínas en las biomembranas.....	49
Sección II. Transporte y Conducción Iónica	
Cap. 3. Vías y modelos de transporte a través de membranas	69
Cap. 4. El potencial de membrana celular en el estado de reposo.....	119
Cap. 5. El transporte Na-K como modelo de transporte activo	135
Cap. 6. Homeostasis intracelular del calcio iónico	151
Cap. 7. Operación orquestada de los sistemas de transporte a través de la membrana plasmática: regulación y mantenimiento del volumen celular.....	177
Sección III. Excitabilidad Celular y Canales Iónicos	
Cap. 8. La electricidad animal y los primeros pasos de la electrofisiología.....	215
Cap. 9. El impulso nervioso	229
Cap. 10. Canales iónicos dependientes del potencial eléctrico	259
Cap. 11. Biología molecular de los canales iónicos.....	283
Cap. 12. Canales de calcio	311
Cap. 13. Canales activados por ligandos.....	335
Cap. 14. Electrobiología de las neuronas del sistema nervioso central	353
Cap. 15. Electrobiología del tejido cardíaco	373
Cap. 16. Reconstitución de canales iónicos	385
Sección IV. Comunicación Intercelular	
Cap. 17. Uniones intercelulares.....	405
Cap. 18. Transmisión sináptica.....	435
Cap. 19. La sinapsis gigante del calamar	455
Sección V. Transducción Sensorial	
Cap. 20. Transducción de señales: participación de las proteínas G.....	477
Cap. 21. Fototransducción	495
Cap. 22. Transducción en los receptores olfatorios	519
Cap. 23. Transducción química en el gusto	537
Cap. 24. Mecanismos de transducción en los quimiorreceptores arteriales. Modulación de los canales iónicos por la tensión de oxígeno.....	549

Sección VI. Contracción Muscular	
Cap. 25. Acoplamiento excitación-contracción en el músculo esquelético.....	573
Cap. 26. Mecanismo de la contracción muscular	609
Sección VII. Secreción y Tráfico de Membranas	
Cap. 27. Exocitosis	651
Cap. 28. Endocitosis mediada por receptor	669
Cap. 29. Acoplamiento estímulo-secreción en la célula β pancreática	681
Listado de Autores.....	705

CAPÍTULO 29

ACOPLAMIENTO ESTÍMULO-SECRECIÓN EN LA CÉLULA BETA PANCREÁTICA

BERNAT SORIA

CONTENIDO

29.1. Introducción. El potencial de membrana de las células endocrinas	683
29.2. Actividad eléctrica y secreción de insulina	683
29.2.1. La glucosa induce un patrón de actividad típico	683
29.2.2. Los cambios del potencial de membrana constituyen la primera etapa	
en el acoplamiento excitación-secreción	685
29.2.2a. Existe una correlación estrecha entre actividad eléctrica y secreción de insulina	685
29.2.2b. A temperaturas bajas se bloquea la secreción de insulina sin modificarse sensiblemente la actividad eléctrica	685
29.2.2c. La secreción de insulina es posterior a la aparición de las espigas	686
29.2.2d. Los factores que modifican las permeabilidades iónicas alteran de forma paralela la actividad eléctrica y la secreción de insulina	686
29.3. Canales iónicos en la célula beta pancreática	687
29.3.1. Canales de K^+	687
29.3.1a. Canal de K^+ dependientes de ATP (K_{ATP})	687
29.3.1b. Canales de K^+ activados por Ca^{+2} (K_{Ca})	689
29.3.1c. Rectificador tardío (K_v)	689
29.3.2. Canales de Ca^{+2}	690
29.3.3. Canal de Na^+	691
29.4. Comunicación celular	691
29.5. Reconstrucción de la actividad eléctrica, modelos	692
29.6. Calcio iónico intracelular y segundos mensajeros	694
29.6.1. Ca^{+2}	694
29.6.2. cAMP	697
29.6.3. Productos del metabolismo de los inositolfosfátidos	697
29.6.4. Araquidonato	697
29.6.5. Proteínas G	697
29.7. Acoplamiento estímulo-secreción	697
29.7.1. La señal de calcio para la secreción de insulina	698
29.7.2. El sistema efector	699
29.8. El islote como órgano neuroendocrino	699
29.9. Resumen	700

29.1.

INTRODUCCIÓN. EL POTENCIAL DE MEMBRANA DE LAS CÉLULAS ENDOCRINAS (2,3,4,6,8,11,22,23,33,43,84)

Hasta hace dos décadas se aceptaba que las únicas células excitables eran las nerviosas, las musculares y algunas células sensoriales. En la actualidad se sabe que la mayor parte de las células endocrinas se incluyen en este grupo. Las células beta pancreáticas fueron las primeras células endocrinas incorporadas al grupo de células excitables. Las células adrenocorticales, adenohipofisarias, cromafines, secretoras de calcitonina son también excitables, es decir, son capaces de generar potenciales de acción y de modificar su potencial de membrana en respuesta a la presencia de secretagogos. Como se discutió en el capítulo de transmisión sináptica (Cap. 18 y 19), en la mayor parte de estas células la secreción coincide con la despolarización de la membrana plasmática. *Es decir, la secuencia de acontecimientos se inicia con la despolarización celular y apertura subsiguiente de canales de calcio dependientes de voltaje. La entrada de calcio aumenta la concentración de Ca^{2+} en el citosol y este aumento, a su vez, pone en marcha la maquinaria exocitótica. Al parecer esta norma tiene excepciones: las células paratiroides y las células secretoras de renina. Al contrario de lo que ocurre con otras células endocrinas estos tipos celulares secretan cuando se hiperpolarizan, mientras que la despolarización inhibe la secreción.*

La célula beta pancreática pertenece al primer grupo y puede utilizarse como ejemplo del acoplamiento excitación-secreción. El objetivo del presente capítulo es analizar los mecanismos biofísicos que ponen en marcha el proceso secretor, incluyendo no solamente la fisiología de la membrana plasmática, sino también la de otras membranas intracelulares y hasta donde se conoce, la integración de todos estos mecanismos en el acoplamiento entre la aparición del secretagogo en el espacio extracelular y la secreción de insulina¹. La relevancia de este tipo de aproximación viene dada no solamente por tratarse del tipo celular cuya disfunción provoca la aparición de la diabetes tipo I y probablemente de otras formas de diabetes y de obesidad, sino también porque la célula beta pancreática constituye un paradigma de la estrecha correlación existente entre las propiedades de los canales iónicos de la membrana, el metabolismo intracelular y el proceso secretor.

Este capítulo se puede escribir gracias al extraordinario avance que los métodos biofísicos han experimentados en los últimos años. Muy especialmente el control del voltaje en parches de membrana ("patch-clamp" véase Cap. 10 y ref. (54)), la utilización de microelectrodos de vidrio de alta resistencia para el registro del potencial de membrana en células de pequeño diámetro y la monitorización de Ca^{2+} citosólico mediante sondas fluorescentes que cambian sus propiedades de absorción y/o emisión en función de la concentración de Ca^{2+} , como indo-1, quin-2 y fura-2 (véase Cap. 25 y ref. (87)). La fisiología de la célula beta pancreática ha sido pionera en numerosos momentos del avance de la ciencia biomédica: la identificación de la hormona secretada por el islote que les valió el Premio Nobel a Banting y Mcleod (sería injusto olvidar aquí la extraordinaria aportación de Best, estudiante de Medicina por aquel entonces; hay una excelente revisión histórica de dicho descubrimiento, del período y del entorno en que se realizó escrita por Michael Bliss, (5)). La insulina fue la primera proteína que se logró secuenciar (Sanger recibió el Premio Nobel por dicho trabajo), el radioinmunoanálisis se puso a punto con la insulina (Berson y Yallow recibieron por ello el Premio Nobel), la insulina humana ha sido una de las primeras hormonas obtenidas por ingeniería genética (se comercializa como Humulina[®]), etc. No es sorprendente que la célula beta pancreática sea la elegida como modelo de acoplamiento estímulo-secreción.

29.2.

ACTIVIDAD ELÉCTRICA Y SECRECIÓN DE INSULINA

29.2.1. La glucosa induce un patrón de actividad característico (64)

El potencial de membrana de la célula beta pancreática fluctúa entre varios estados. En condiciones de reposo mantiene un potencial de membrana a aproximadamente -70mV. Cuando es expuesta a la acción de un secretagogo como la glucosa las células se despolarizan y disparan potenciales de acción. Para concentraciones ligeramente superiores al umbral (5-7 mM) los potenciales de acción se organizan en ráfagas, mientras que para concentraciones superiores la descarga es continua. Las ráfagas de potenciales de acción coinciden con la secreción hormonal (Fig. 29.1.A).

1. El islote de los mamíferos contiene, al menos, cuatro tipos de células, A, B, D y PP, responsables respectivamente de la síntesis, almacenamiento y secreción de glucagón, insulina, somatostatina y polipéptido pancreático. La insulina juega un papel clave en la regulación de la homeostasis energética. Los déficits o los excesos en su secreción conducen a situaciones patológicas como la diabetes y ciertos síndromes hipoglucémicos. Las concentraciones de glucosa se expresan frecuentemente con cifras aparentemente arbitrarias (5.6, 11.1, 16.7 o 22 mM). Esta notación es importante porque éstas son las cifras que se utilizan con frecuencia en clínica y corresponden a 1, 2, 3 y 4/l. Una concentración de 1 g/l está considerada la concentración de glucosa en sangre (glucemia) normal en ayunas. Después de una comida es normal tener una hiperglucemia (>2 g/l), pero si ésta se mantiene más alta de 2-3 h. nos encontramos con un trastorno en la regulación de glucemia. La causa más frecuente son las entidades clínicas conocidas como diabetes.

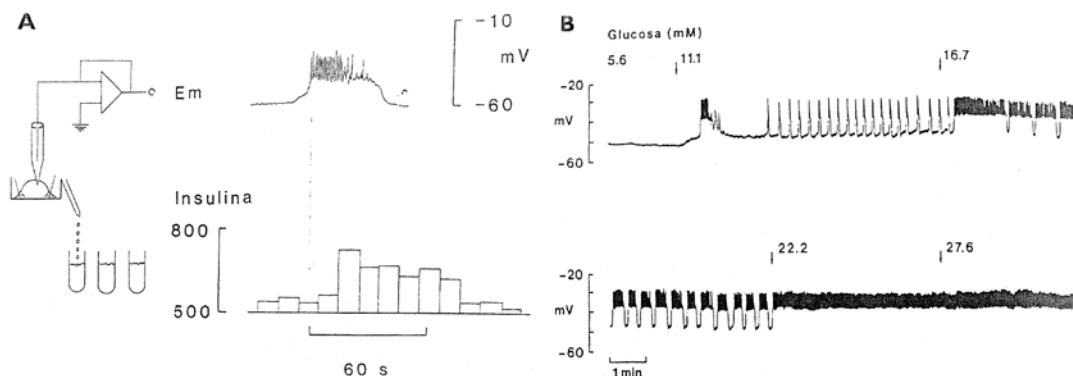


Figura 29.1. Actividad eléctrica y secretora inducida por glucosa en la célula beta pancreática del ratón. **A.** Esquema del dispositivo experimental utilizado para registro simultáneo de la actividad eléctrica y la colección de muestra de perifusado en el que se determina la insulina mediante radioinmunoanálisis. En la parte derecha se muestra una oscilación lenta expandida y la insulina liberada durante este período expresada en pg/islote/min. En este experimento se utilizaron islotes de ratones ob/ob, cuyas características permitieron realizar este tipo de experimento. (a partir de Rosario et al. 69). **B.** Registro continuo de la actividad eléctrica en un islote sometido a concentraciones crecientes de glucosa (desde 5,6 a 29,6 mM, es decir de 1 a 5 g/l).

La figura 29-1B muestra la actividad eléctrica de una célula β en presencia de concentraciones crecientes de glucosa. También se muestra a una escala temporal ampliada una fase activa o "ráfaga" de una célula beta y la medición simultánea de la liberación de insulina del islote. El registro del potencial de membrana se realiza mediante la introducción de un microelectrodo de alta resistencia (100-200 M Ω). Dado que la penetración de una célula β se realiza sin un control visual de la célula que se está empalmando, la primera pregunta que cabe hacerse es: ¿qué evidencia hay de que se trata de una célula β y no de cualquier otro tipo celular del islote, A, D o PP? Durante mucho tiempo solo se han tenido evidencias de tipo indirecto, por ejemplo, criterios probabilísticos, simultaneidad y correlación con secreción de insulina, etc. Más recientemente, Meda, Santos y Atwater (47) consiguieron inyectar colorantes a través del electrodo de alta resistencia e identificaron la célula registrada como tipo β mediante técnicas inmunohistoquímicas.

En los primeros trabajos, Dean y colaboradores (22,23,24) establecieron el patrón de respuesta a la glucosa e identificaron las espigas como debidas a la entrada de calcio; las espigas desaparecen en ausencia de Ca^{2+} o en presencia de bloqueantes del canal de calcio. Se acentúan por alto calcio extracelular y por agonistas del canal de calcio. Más adelante tendremos ocasión de desarrollar los mecanismos iónicos que subyacen a la génesis de la actividad eléctrica en la célula beta, ahora veremos cual es el patrón de respuesta que se observa cuando el islote es expuesto a concentraciones crecientes de glucosa. En ausencia de glucosa, o en presencia de una baja concentración del azúcar, el potencial de membrana es estable y suele estar comprendido entre -70 y -80 mV es decir, cerca del potencial de equilibrio para el potasio. La estimulación con glucosa (11.1 mM = 2 g/l) despolariza la membrana plasmática y desencadena una actividad eléctrica típica. En primer lugar la célula se despolariza 10-15 mV con lo que se alcanza un nivel umbral y a continuación, se inicia la actividad eléctrica que muestra un patrón bifásico. Existe una fase de mayor duración con descarga continua de espigas seguida de una fase silente. A partir de este momento se inicia una actividad consistente en ondas lentas de despolarización sobre las que se superponen ráfagas de potenciales de acción (fase activa). A medida que aumenta la concentración de glucosa varía paralelamente el curso temporal del patrón de respuesta en ráfagas y la célula consume más tiempo en la fase activa. La fracción de tiempo en fase activa y la frecuencia de espigas aumenta de forma sigmoidea con la concentración de glucosa. Si la concentración de glucosa es mayor (superior a 20 mM, aprox. 4 g/l) la despolarización es mantenida y la célula dispara de forma continua. Existe una cierta variabilidad celular en el umbral de respuesta a la glucosa (la despolarización inicial y patrón de respuesta en ráfagas puede iniciarse para valores entre 5 y 10 mM de glucosa). Asimismo la respuesta oscilatoria no es privativa de la glucosa y se puede apreciar también en presencia de otros monosacáridos, gliceraldehído, leucina, alfa-cetaisocaproato, fenilpiruvato, el análogo de leucina BCH y para concentraciones bajas de tolbutamida (para una revisión más detallada véase la referencia (36)). En la figura 29-2, que muestra la relación existente entre la concentración de glucosa por una parte y la frecuencia de espigas y secreción de insulina por otra, se aprecian varias zonas que se corresponden con la actividad descrita: para una concentración de glucosa de 0 a 5 mM, no hay ni espigas ni secreción de insulina, de 5 a 10 mM (umbral) se inician ambos fenómenos, entre 11 y 22 mM hay una zona de transición en la que la descarga es de tipo oscilatorio y coincide con la fase ascendente de la curva dosis-efecto, mientras que para concentraciones superiores a 22 mM la descarga eléctrica es continua y la secreción de insulina alcanza su máximo.

29.2.2. Los cambios del potencial de membrana constituyen la primera etapa del acoplamiento estímulo secreción

29.2.2a. Existe una correlación estrecha entre actividad eléctrica y secreción de insulina (63,71)

Se ha podido comprobar que todas las variables que reflejan entrada de calcio (frecuencia de espigas, la fracción de tiempo en fase activa y la varianza de las fluctuaciones del potencial de membrana) se correlacionan bien con la secreción de insulina. Se sabe que la secreción de insulina se debe al aumento citosólico del Ca^{2+} . Puesto que la entrada de Ca^{2+} se produce básicamente durante los potenciales de acción, podemos inferir una estrecha relación entre la actividad eléctrica y la secreción de insulina. La figura 29-2 muestra este tipo de relación. También se observa una estrecha correlación entre secreción de insulina y la duración de las oscilaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (ver 29.8.1 donde se discute su posible significación).

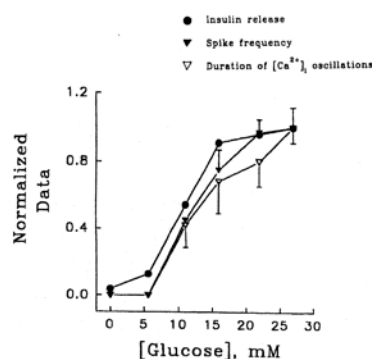


Figura 29.2.

Correlación entre la actividad eléctrica de la célula β (expresada en frecuencia de espigas) y secreción de insulina del islote que se está registrando (Modificado de (83)).

Mediante un cálculo sencillo es posible estimar la corriente iónica neta que atraviesa la membrana durante un potencial de acción. Si se acepta que el interior de la célula es isopotencial, es decir, el potencial eléctrico a través del citosol es el mismo, la corriente que fluye a través de la membrana cuando se descarga el condensador transmembrana y viene dado por (Cap. 9)

$$I_m = -C_m dV/dt \quad (29.1)$$

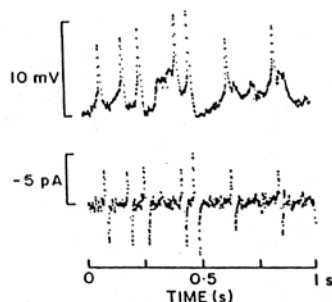


Figura 29.3.

Estimación de la corriente neta que atraviesa la membrana a partir de un registro del potencial. La parte superior muestra un grupo de potenciales de acción registrados en una célula β pancreática en presencia de glucosa 11.1 mM. La parte inferior es la primera derivada con respecto al tiempo (dV/dt). Cada potencial de acción posee una corriente de entrada (hacia arriba en la figura) y una corriente de salida (hacia abajo). Note que dV/dt se representa en sentido opuesto al que convencionalmente se utiliza para las corrientes. En el cálculo de la corriente se ha considerado que la capacidad total de la membrana es de 5 pF. (Tomado de Soria y Ferrer, (81)).

donde C_m es el valor de la capacidad de una célula (aprox. 5 pF) y dV/dt la primera derivada del potencial de membrana. El valor neto máximo estimado para I_m oscila entre 5 y 10 pA. La velocidad máxima de la corriente despolarizante durante el potencial de acción se alcanza a un potencial de membrana de -30 mV. Para este potencial de membrana y con las corrientes de salida bloqueadas, la corriente de entrada de calcio que se registra es de unos 20 pA, un valor cercano a los estimados. La densidad de la corriente de entrada de calcio en la célula beta pancreática es inferior a la que se registra en otras células secretoras como las células GH3 o las cromafines, lo que sugiere una menor densidad de canales iónicos abiertos durante el potencial de acción. Más adelante (sección 29.3.3) se discutirá la importancia fisiológica de esta observación.

29.2.2b. A temperaturas bajas se bloquea la secreción de insulina sin modificarse sensiblemente la actividad eléctrica (18)

La observación simultánea de actividad eléctrica y secreción de insulina no implica de forma unívoca que la secreción de insulina sea consecuencia de los cambios en el potencial de membrana. Por el contrario, podría esgrimirse el argumento que las oscila-

ciones del potencial de membrana pueden deberse a la fusión de los gránulos con la membrana. Para contestar eficazmente esta pregunta hay que mostrar si pueden separarse ambos fenómenos, es decir, si puede bloquearse uno de ellos respetando el otro con lo que puede descartarse que uno de ellos sea causa del otro. Esto se consiguió en experimentos en los que se disminuyó la temperatura de 37 °C a 25 °C. Para temperaturas del orden de 25 °C la exocitosis se bloquea completamente (el coeficiente de temperatura del proceso exocitótico es mucho mayor que el de las permeabilidades iónicas), mientras que a esta temperatura la respuesta eléctrica de la célula a la glucosa se mantiene intacta. Por lo tanto las variaciones del potencial de membrana no se deben a la exocitosis. La figura 29.4 muestra un experimento en el que la disminución de temperatura provoca la desaparición de la secreción de insulina en un islote en el que simultáneamente se está registrando la actividad eléctrica, que permanece intacta.

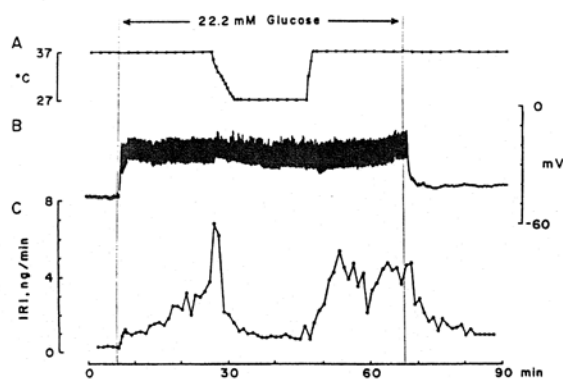


Figura 29.4.
 Efecto del descenso de temperatura (de 37 a 29 °C) sobre el potencial de membrana y la secreción de insulina durante la perfusión con glucosa 22,2 mM. En A se muestra la evolución de la temperatura a lo largo del experimento. En B y C se representa el potencial de membrana y la secreción de insulina respectivamente medidos de forma simultánea en un islote de Langerhans (tomado de Atwater et al (18)).

29.2.2c. La secreción de insulina es posterior a la aparición de las espigas:

Cuando se somete al islote a un cambio brusco en la concentración extracelular de glucosa desde una concentración subestimuladora (< 7mM) a una estimuladora (> 10 mM) y se miden simultáneamente la actividad eléctrica y la secreción de insulina puede apreciarse que la aparición de las espigas precede a la secreción de insulina. En la figura 29-1 puede observarse como la secreción de insulina es posterior a la aparición de la primeras espigas. Lo que una vez más confirma que la secreción es una consecuencia de la actividad eléctrica y no una causa.

29.2.2d. Los factores que modifican las permeabilidades iónicas alteran de forma paralela la actividad eléctrica y la secreción de insulina (13,16,27,29,34,44)

La utilización de bloqueadores y activadores de las permeabilidades iónicas permite disecar el papel que las mismas pueden tener en el proceso secretor. Así por ejemplo, tolbutamida y glibenclamida, que bloquean el canal de K⁺ dependiente de ATP, despolarizan la membrana (lo que provoca la apertura de canales de calcio) y causan, incluso en ausencia de glucosa, secreción de insulina simultánea con la descarga. El diazóxido, que es un activador de este canal de potasio, posee el efecto opuesto. Por otra parte, tanto los bloqueadores inorgánicos del canal de calcio (Co²⁺, Cd²⁺) como los orgánicos (verapamil y las dihidropiridinas, véase ref. (44)) bloquean la secreción de insulina.

Existen, por lo tanto, suficientes argumentos a favor de que los cambios de potencial de membrana constituyen los primeros pasos en la cadena de acontecimientos que acoplan la presencia de glucosa a la secreción de insulina.

TABLA 29.1. Características y papel fisiológico de los canales iónicos en la célula beta pancreática

Canal	Características	Papel Fisiológico
K _{ATP}	Bloqueado por ATP	Potencial de reposo
K _{Ca}	Activado por Ca y voltaje	Hiperpolarizaciones
K _v	Activado por voltaje	Repolarización potencial de acción
Ca(SD)	Inactivación rápida	Oscilaciones lentas
Ca(FD)	Inactivación lenta	Despolarización poten. acción
Na ⁺	Inactivado al potencial de reposo	Desconocido

29.3.

CANALES IÓNICOS EN LA CÉLULA BETA PANCREÁTICA

La activación eléctrica viene determinada por la conducta por la conducta y propiedades de los canales iónicos. En este apartado se estudiarán las propiedades de los canales iónicos descritos en la membrana plasmática de la célula beta pancreática (Tabla 29.1). En cada canal se verá también cual es su papel fisiológico con el fin de averiguar como la célula beta constituye la respuesta eléctrica a las variaciones de secretagogos en el entorno extracelular. Las membranas intracelulares también poseen canales iónicos y aunque se sabe bastante menos de su fisiología, se supone que operan de forma similar a los situados en la membrana plasmática. Sus propiedades fisiológicas se estudiarán cuando veamos los mecanismos intracelulares que participan en el acoplamiento excitación-secreción.

En la membrana plasmática de la célula beta pancreática se han descrito los siguientes canales:

29.3.1. Canales de potasio

Se han identificado varios canales de potasio: el canal de K^+ regulado por ATP (K_{ATP}), dos canales activados por calcio y voltaje (maxi K y otro de menor conductancia) (K_{Ca}), el rectificador tardío (K) y un cuarto canal de baja conductancia (aprox. 7-10 pS con 140 mM K^+ en el interior de la pipeta) que se bloquea por ATP.

29.3.1a. Canal de potasio dependiente de ATP (K_{ATP}) (13,14,16,20,21,25,30,31,32,82)

En la célula beta en reposo la permeabilidad dominante es la debida al canal de potasio regulado por ATP (K_{ATP}) (13,14,21,57). Se trata de un canal que se inhibe por ATP aplicado por la cara interna de la membrana. Ashcroft y col (13,14) lo llamaron canal G porque su actividad disminuye cuando se aplica glucosa a células intactas. Este canal disminuye también su probabilidad de apertura en presencia de otros nutrientes como manosa, leucina, gliceraldehído y alfacetisocaproato. Este grupo de sustancias poseen la característica común de metabolizarse y producir un aumento del ATP intracelular y todos ellos pertenecen a la categoría de **iniciadores** de la secreción de insulina. Lactato y arginina, que actúan como **potenciadores** de la secreción inducida por un iniciador, no afectan a este canal (aunque si disminuyen la apertura del canal K_{Ca} ; véase ref. (65)). Se trata de un canal regulado metabólicamente cuyas propiedades lo convierten en firme candidato a "sensor de glucosa" en las células beta pancreáticas y posiblemente en otras células como las hipotalámicas responsables de la sensación de hambre y de saciedad. Por último, un canal con estas características puede ser de utilidad como mecanismo de protección frente a la isquemia celular en células nerviosas o en miocardio. La isquemia induce una disminución en la concentración intracelular de ATP, como consecuencia el canal estará activado y la célula se hiperpolarizará, lo que impide la apertura de canales de Ca^{2+} y, por lo tanto, el aumento del $[Ca^{2+}]_i$, lo que en condiciones de bajo [ATP] es extremadamente tóxico.

PROPIEDADES (14,16,25,30,31,57,82) La conductancia del canal único medida en parches escindidos en un medio simétrico (140 mM K^+) está entre 50 y 80 pS y la relación I-V es lineal. Sin embargo en registros sobre célula intacta el canal rectifica (en un medio simétrico las corrientes de salida son menores que las de entrada). Parece claro que la principal causa de la rectificación es el bloqueo dependiente de voltaje de las corrientes de salida por cationes intracelulares, principalmente Na^+ y Mg^{2+} . El grado de rectificación ha sido utilizado para estimar las concentraciones citosólicas de Na^+ (30 mM) y Mg^{2+} (1 mM) (65).

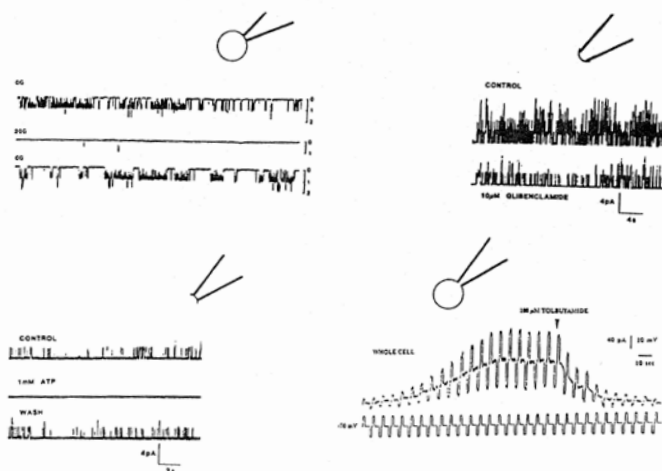


Figura 29.5.

Propiedades del canal de K^+ dependiente de ATP. **A.** Bloqueo del canal al ser expuesta la célula a glucosa 20 mM (registro en cell-attached).

B y C. La aplicación de ATP (1 mM) por la cara interna de la membrana o de glibenclamide (10 μM) por la cara externa bloquean el canal.

D. Método para medir la conductancia total de la célula en reposo a partir del potencial impuesto (-70 mV) se aplican pulsos de 10 mV. El registro de corrientes se inicia al pasar al modo de "whole-cell" desde el "cell-attached". La conductancia total de la membrana en la célula β en reposo es de 6-7 nS. De ellos 4-5 nS deben al canal de K^+ dependiente de ATP. El resto puede deberse a la corriente de fuga o a algún canal no identificado. A partir de 13, 16, 21 y 82.

La figura 29-5 muestra ordenadas en una secuencia que pretender ser didáctica una serie de observaciones que permiten identificar las principales propiedades fisiológicas y farmacológicas de este canal. En A se observa el efecto de la glucosa sobre este canal (registrado en una célula intacta, "cell-attached"). Esta fue la primera observación: *la presencia de una conductancia que se bloquea en presencia de glucosa*. En B se identifica el posible mecanismo: *el aumento de ATP intracelular es el responsable del bloqueo del canal*. Para ello se comprobó el efecto del ATP aplicado a la cara interna de la membrana (en parches escindidos). En C se muestra el efecto de glibenclamida (un antidiabético oral) sobre dicho canal. La técnica de registro y de aplicación de glibenclamida es similar que en B. Por último, queda por aclarar la contribución de dicha permeabilidad a la conductancia total de la célula en reposo. Este punto se explora en D, donde se muestra el curso temporal de la conductancia en reposo (-70 mV) a partir del momento en que se pasa del "cell attached" al modo "whole-cell", con lo que el ATP intracelular se diluye en el interior de la pipeta de patch (el medio intrapipeta contiene 0.3 mM ATP con lo que se intercambia una concentración 3-5 mM ATP por 0.3 mM) hay un aumento de la conductancia total de la membrana que pasa de 2 a 6 nS. Una vez que se alcanza el estado estacionario se aplica en el baño una concentración saturante de sulfonilurea (tolbutamida 50 μ M en este caso) lo que bloquea la totalidad de canales dependientes de ATP. Con este método se ha determinado la conductancia total de la célula en condiciones de reposo (a -70 mV), un valor que oscila entre 6 y 7 nS.

INTERACCIÓN CON EL ATP: El ATP intracelular posee dos efectos básicos sobre el canal: bloqueo (la forma activa es el ATP libre: ATP, ATP₄⁻, ATP₃⁻) y modulación (ATP-Mg es necesario para mantener el canal en condiciones fisiológicas). La propiedad más característica de este canal es su bloqueo por ATP intracelular (la probabilidad de apertura del canal disminuye con la aplicación de ATP en su cara citosólica). Este es un efecto directo de la molécula y no parece mediado por la fosforilación del canal ya que los análogos no hidrolizables de ATP son capaces de producir un bloqueo similar en parches encendidos. La secuencia de efectividad de los derivados de adenina es similar a la del receptor purinérgico tipo P₂ (ATP > ADP > AMP > Adenosina. Los receptores purinérgicos son receptores de membrana sensibles a las concentraciones extracelulares de ATP, siendo también activados por ADP, AMP y adenosina. Su papel en la fisiología del sistema nervioso es aún objeto de discusión y nos alejaría del objetivo general de este capítulo, pero constituye el primer ejemplo de interacción de un nucleótido con una proteína de membrana. La acción de los nucleótidos sobre este canal es compleja. Así, el ATP, que se pensó inicialmente que solo bloqueaba el canal K_{ATP}, también reactiva los canales tras el "lavado". Este efecto, al contrario de lo que ocurre con el bloqueo, parece depender del Mg²⁺. Es decir, el ATP, que se comporta como un bloqueador a concentraciones más altas, es necesario para que el canal mantenga una probabilidad alta de apertura. En la Fig. 29.6 D, el interior de la pipeta contenía 0,3 mM ATP lo que permitió estudiar durante un largo período la conductancia del canal de potasio dependiente de ATP. Más recientemente, la utilización de un protocolo que impide el "lavado" de los canales dependientes de ATP ha permitido precisar el valor de la constante aparente de disociación en 18 μ M. Parece difícil reconciliar la extraordinaria sensibilidad para el ATP del canal K_{ATP} con las concentraciones intracelulares de dicho nucleótido (normalmente en el intervalo nM). En experimentos más recientes se ha podido comprobar que la actividad del canal está controlada por el cociente ATP/ADP (ADP compite con el ATP e inhibe la inhibición. Este canal está también regulado por pH y por Mg²⁺.

De cualquier forma, todo parece indicar que se trata de un canal con una modulación compleja en la que participan segundos mensajeros, el potencial redox intracelular (NADPH/NADP), proteínas G, etc. En estudios realizados en la configuración de "célula abierta" en los que se mantiene la integridad del citoesqueleto y de ciertas estructuras se ha comprobado que el proceso de lavado es mucho más lento y que el ATP, incluso a concentraciones de 5 mM, no llega a bloquear completamente el canal.

FARMACOLOGÍA. (1,11,16,32,68) El canal de potasio dependiente de ATP, o un péptido asociado al mismo, se considera el sitio diana para el efecto de las sulfonilureas hipoglucemiantes. Tolbutamida y glibenclamida se unen a un receptor y "congelan" el canal en su configuración cerrada. Esta propiedad permite utilizar dichos fármacos como marcadores del canal K_{ATP} (o de una proteína asociada al mismo) y representar un papel similar a de la TTX para el canal de Na⁺, la w-conotoxina y las dihidropirinas para determinadas subunidades de los canales de calcio y la apamina y la caribdotoxina para ciertos canales de potasio. En ausencia de glucosa las sulfonilureas son capaces de despolarizar la célula beta e iniciar la descarga continua de espigas.

Es importante señalar que este canal posee una respuesta alterada a sulfonilureas (glibenclamida, tolbutamida) y quinina en ratones obesos e hiperglucémicos. Estos ratones, por otra parte, son sensibles a la apamina (un bloqueador del canal de K activado por Ca²⁺ de baja conductancia que no afecta a los ratones normales). Esta puede ser una indicación de "donde" buscar alteraciones en los trastornos en la secreción de insulina en algunas formas de diabetes. En humanos el canal K_{ATP} posee idénticas propiedades en cuanto a conductancia, cinética, sensibilidad al ATP e inhibición por sulfonilureas.

TABLA 29.2. Modulación fisiológica y farmacológica del canal de K⁺. (*) Indica que el efecto está mediado por una proteína G

	Bloqueadores Ref.	Activadores
Fisiológica	ATP	Galanina (*) Somatostatina(*)
Farmacológica	Glibenclamida Tolbutamida Barbitúricos	Diazóxido

Utilizando la configuración de "cell-attached" se ha podido comprobar que este canal se bloquea para concentraciones bastante bajas de glucosa (5 mM) por lo que se puede pensar que este canal contribuye solamente a una despolarización inicial de aproximadamente 5-10 mV y que no participaría en la respuesta oscilatoria. Para la génesis de ondas lentas se necesitaría de la participación de otro canal, posiblemente el canal por Ca^{2+} y voltaje (K_{Ca}) que funciona en el intervalo de concentraciones citosólicas de Ca^{2+} y de potenciales de membrana que se darían en la respuesta oscilatoria.

En parches escindidos se ha podido observar un segundo canal sensible a ATP. Es de menor conductancia (5 pS para corrientes de salida en 140 mM K^+ y aproximadamente 4 pS en condiciones fisiológicas) y del que se desconoce todavía su papel fisiológico.

29.3.1b. Canales de K^+ activados por Ca^{2+} y por voltaje (K_{Ca}) (32,42,82)

Se trata de un canal del tipo de los maxi-K (según la terminología introducida por Latorre y Miller (42), que está prácticamente inactivo al potencial de reposo y cuya conductancia es de aproximadamente 200 pS en un parche escindido expuesto a un medio simétrico en K^+ y de 140 pS en la configuración de "cell-attached" con 140 de K^+ en el interior de la pipeta y 30 mM en el baño. Se activa por la despolarización y por el Ca^{2+} intracelular. Asimismo el aumento de glucosa inhibe a este canal por mecanismos diferentes a los estudiados con el canal que depende de ATP. La probabilidad de apertura de este canal disminuye con la acidificación (de 7.2 a 6.8) y aumenta con la alcalinización (de 7.2 a 7.6) del medio intracelular. El probable significado fisiológico de estos resultados no es evidente, aunque algunos autores la han incluido en sus modelos.

Al igual como ocurre en otros tejidos, el Mg^{2+} (1-10 mM) aplicado por la cara interna aumenta la afinidad aparente del canal por el Ca^{2+} y aumenta también la sigmoidicidad de la curva de activación (el número de iones Ca^{2+} envueltos en la reacción de apertura del canal aumenta en presencia de Mg^{2+}).

Como se trata de un canal cuya probabilidad de apertura depende del Ca^{2+} citosólico y del potencial transmembrana y como no se dispone de un bloqueador específico para el rectificador tardío (se ha postulado que forskolina bloquea al rectificador tardío mediante un mecanismo independiente de cAMP) no es fácil diseñar las condiciones experimentales adecuadas para observarlo mediante "whole-cell" clamp, ya que la despolarización activa tanto el rectificador tardío como el canal K_{Ca} y lo que se registra es la suma de ambas corrientes de salida. Una forma indirecta de observarlo es sustraer las corrientes de salida en ausencia y presencia de un bloqueador del canal de calcio mientras se perfunde el interior intracelular con un solución con baja capacidad de amortiguación para el Ca^{2+} (por ejemplo 1 mM Ca , 1 mM EGTA). En estas condiciones el calcio intracelular puede fluctuar con la entrada de calcio y activar los canales de potasio dependientes de calcio y voltaje. Aunque se desconoce la actividad iónica del calcio en el citosol puede construirse una gráfica corriente-voltaje. La figura 29-6 muestra el resultado de un experimento de este tipo en célula beta pancreática de rata.

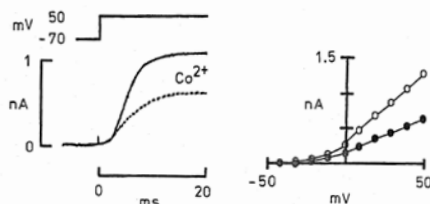


Figura 29.6.

Corrientes de salida activadas por voltaje a través del rectificador tardío (K_r) y del canal de K^+ activado por Ca^{2+} (K_{Ca}). A la izquierda se aprecia la corriente total de salida de K^+ y el efecto del Co^{2+} (que al bloquear la entrada de Ca^{2+} impide la activación de K_{Ca}). La gráfica intensidad-voltaje para la corriente total y tras el bloqueo del componente activado por Ca^{2+} se muestra a la derecha.

En la célula beta este canal es bloqueado por tetraetilamonio (TEA), caribdotoxina y Ba^{2+} . TEA bloquea el canal a concentraciones relativamente bajas (1-2 mM) que no afectan prácticamente al canal K_{ATP} . Por su dependencia de voltaje y por el efecto del TEA sobre los potenciales de acción puede postularse que este canal participa en el proceso de repolarización de las espigas. Se ha propuesto también una participación de este canal en la repolarización de las ondas lentas, activado por el aumento del calcio citosólico que se produce durante la ráfaga de potenciales de acción.

29.3.1c. Rectificador tardío (K_r) (66,82)

Se trata de un canal similar al descrito en el axón gigante del cefalópodo y en otras muchas preparaciones. Es activado por la despolarización y sigue un comportamiento cinético que se ajusta bien al modelo de Hodgkin y Huxley (véase caps 9 y 10). Se ha descrito en "whole-cell" y no se modifica por concentración de Ca^{2+} o de ATP en el citosol. En parches escindidos se registra un canal de aproximadamente 10 pS cuyas propiedades cinéticas y farmacológicas son similares a las del rectificador tardío.

29.3.2. Canales de calcio (60,66,71,78,82)

La corriente transportada por calcio ha sido demostrada en células beta de ratón, rata (Figura 29.8), humana y en las líneas tumorales RINm5F y célula HIT. Todas ellas se comportan según un patrón similar. Se trata de una corriente de calcio que se activa para potenciales de membrana superiores a -50 mV y que inactivan muy lentamente. Existen bastantes evidencias de que la inactivación es calcio-dependiente es decir, la inactivación es más marcada a potenciales para los que entra más Ca^{2+} en la células. Además, mediante protocolos de dos pulsos se obtiene una curva en forma de U y cuando el portador de corriente es el bario no se observa inactivación. Las corrientes de entrada son bloqueadas por los bloqueadores orgánicos (nifedipina, nitrendipina) e inorgánicos (Co^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+}) del canal de calcio y son activadas por Bay-K 8644 y CGP 28392. Los canales de calcio en la célula beta son 1.5-2 veces más permeables al Ba^{2+} que al Ca^{2+} . Todas estas características lo sitúan entre los canales de calcio tipo L o de alto umbral. Utilizando técnicas de registro de canal único (71) se pudo comprobar la presencia de dos tipos de canales de Ca^{2+} en célula β de rata.

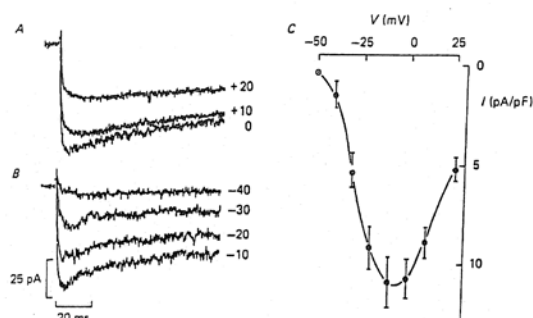


Figura 29.7.

Corrientes de entrada de Ca^{2+} . Corrientes de entrada obtenidas en el modo de "whole-cell" en célula beta pancreática de ratón. El medio intracelular contiene N-metilglucamina como sustituto no permeable del K^+ y el medio extracelular se ha enriquecido con Ca^{2+} (la concentración fisiológica en mamíferos es aproximadamente 2,5 mM, mientras que aquí se utiliza 10 mM). La gráfica intensidad-voltaje (a la derecha) representa la densidad de corriente en pA/pF, una forma útil cuando se desconoce la superficie de la membrana (Tomado de 66).

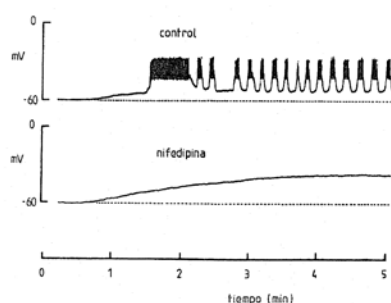


Figura 29.8.

Papel fisiológico de las corrientes de calcio de alto umbral (FD). La nifedipina es un bloqueador específico del canal de alto umbral (tipo L o FD), bloquea las espigas y por tanto, no hay oscilaciones lentas del potencial de membrana que necesita de entrada de Ca^{2+} .

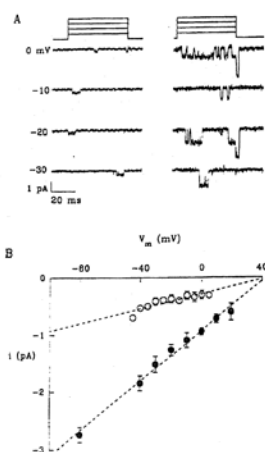


Figura 29.9.

La corriente de Ca^{2+} posee dos componentes. A: Registros en dos parches en los que se registró la actividad de un solo tipo de canal de Ca^{2+} de baja (izquierda) y alta conductancia (derecha). Potencial de holding = -80 mV. B: Relación I-V para cada subtipo. (Tomado de Sala y Matteson, 1990).

Como se ha visto en el Cap. 12, en vertebrados se han descrito tres tipos de canales de Calcio, T, L y N. La célula beta pancreática posee un canal tipo L, es decir: 1) Poca o nula inactivación por cambios de voltaje, 2) Inactivación calcio-dependiente 3) Sensibilidad a Cd^{2+} en el intervalo micromolar, 4) Sensibilidad a dihidropiridinas 5) En el modo de "whole-cell" hay una desaparición progresiva de la actividad del canal, proceso que ha recibido el nombre de lavado ("wash-out" o "run down") y 6) En presencia de Ba^{2+} 110 mM las corrientes unitarias tienen una conductancia de 20-30 pS. El canal de alto umbral es el responsable de las espigas ya que cuando se bloquea este canal con nifedipina (figura 29-9) hay un bloqueo selectivo de las mismas, sin afectar a la despolarización inicial (por bloqueo de canales de K_{ATP}).

Algunos autores han creído ver también un canal de calcio de bajo umbral. El ajuste de dos exponenciales a las colas ha permitido a Hiriart y Matteson (38) proponer dos poblaciones de canales (SD, que desactivan lentamente o "slow deactivating" y FD que desactivan rápidamente o "fast deactivating"). *El canal de calcio de bajo umbral corresponde al de desactivación lenta y posee algunas de las características del canal tipo T. Este canal sería responsable de las oscilaciones lentas que se traduce en la periodicidad de las fases silentes y las fases activas, mientras que el de alto umbral (FD, tipo L) participaría en la génesis de las espigas.*

Las propiedades de las corrientes unitarias registradas mediante "patch-clamp" son similares a las encontradas para las corrientes de calcio de alto umbral. Para condiciones fisiológicas (Ca^{2+} , 2.6 mM) puede estimarse una conductancia de aproximadamente 2 pS (su conductancia fue estimada por estudios de análisis de ruido del potencial de membrana en unos 5 pS, véase ref. (31), lo que corresponde a aproximadamente 0.1 -0.2 pA a -25 mV o 0.05 - 0.1 pA a 0mV. Una estimación razonable de la densidad de canales nos da entre 500 y 1000 canales por célula beta. Esta densidad es más que suficiente para generar potenciales de acción pero es claramente inferior a la de otras células secretoras como la célula cromafín o la célula GH3. Si se tiene en cuenta que la estimación de corriente de entrada nos daba unos valores de 5 a 10 pA esto significa la activación simultánea de 50-100 canales por célula, es decir solamente un 10% se activarían durante un potencial de acción. La densidad de los canales de Ca^{2+} puede ser importante si se piensa en la extraordinaria capacidad de amortiguación de este catión divalente que posee el citosol y que, por lo tanto, solo puede ocurrir aumentos intensos en la actividad iónica cerca de la boca del canal (véase Caps. 18 y 19). Si se considera que los canales se distribuyen al azar en la superficie de la membrana, el problema aún sería mayor, la distancia entre canales sería de aproximadamente 2 μm lo que dejaría hasta 10 gránulos en el espacio entre dos canales. ¿Cómo puede el calcio entrante alcanzar a todos los gránulos?

29.3.3. Canal de Sodio

La célula beta pancreática de la rata y del ratón posee una corriente rápida de entrada que puede ser identificada como debida a la corriente a través del canal de sodio en función de los siguientes parámetros: se bloquea por TTX 1 μM , tiene un potencial de inversión cercano al potencial de equilibrio del Na^+ y se inactiva rápidamente. La dependencia de voltaje difiere de la de la corriente de entrada de Ca^{2+} . Se activa para potenciales de membrana superiores a -30 mV, mientras que la corriente de calcio se activa para potenciales de membrana superiores a 50 mV. Un rasgo peculiar de esta corriente de entrada es la dependencia de voltaje del proceso de inactivación. En la célula beta la conductancia al Na^+ está completamente inactivada al potencial de reposo. El componente de entrada solo se activa si el potencial de membrana es mas negativo, igual o (más hiperpolarizado) que -110 mV. De la inspección de la curva h_{∞} se desprende que se necesita hiperpolarizar la membrana hasta -140 mV para elicitar el total de la corriente de Na^+ y que a un potencial de aproximadamente 100 mV, el 50% de la corriente está inactivada. El papel que la corriente de sodio pueda jugar en el proceso de acoplamiento excitación-secreción continua siendo un enigma.

Se trata de un canal sensible a TTX 1 μM ; sin embargo, el único efecto que produce TTX es un retraso en la aparición de la actividad eléctrica (datos no publicados de Sanchez-Andrés y Soria) y de la secreción de insulina cuando el islote es sometido a un cambio brusco de 0 a 10 mM glucosa. Ni la actividad eléctrica ni la secreción de insulina en estado estacionario se modifican por TTX. Puede pensarse que participa en los cambios intensos que tienen lugar en el islote cuando es estimulado con una concentración estimuladora de glucosa. También es importante hacer notar que se ha comprobado que tras el cierre del canal dependiente de ATP, la despolarización necesita de una corriente de entrada que depende de Na^+ .

29.4.

COMUNICACIÓN CELULAR (26,46,74,76,90)

Existen evidencias histológicas y electrofisiológicas de que las células del islote están conectadas mediante uniones intercelulares. La primera evidencia electrofisiológica del acoplamiento entre células pancreáticas la obtuvo Meissner (48) mediante registro intracelular en dos células vecinas. En estas condiciones se observa que las fluctuaciones del potencial de membrana registrado con microelectrodos se producen de forma sincrónica en ambas. La Figura 29-10 muestra un registro con estas características.

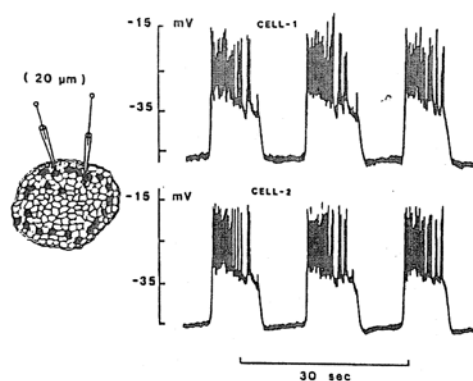


Figura 29.10.

Acoplamiento eléctrico entre células vecinas en un islote de ratón: Los registros se obtuvieron simultáneamente en dos células separadas por una distancia de aproximadamente 20 μm (tomado de Atwater et al, 1988).

Los estudios morfológicos han mostrado la existencia de **uniones en hendidura** (véase Cap. 17). Dichas uniones son permeables a iones, colorantes (amarillo Lucifer, carboxifluoresceína) y moléculas pequeñas (peso molecular < 1000 D). A partir de estas observaciones se ha postulado el acoplamiento metabólico, eléctrico y iónico.

Cuando se registran dos células cercanas en un islote puede observarse que la corriente inyectada en una de las células se propaga sobre distancia de aproximadamente 35 μm . Al cociente entre la corriente inyectada y la registrada en otra célula se le llama índice de acoplamiento y nos informa acerca de la resistencia eléctrica existente a través de las uniones en hendidura. En determinadas condiciones el índice de acoplamiento puede llegar a ser igual a 1. El análisis de las amplitudes de los potenciales de acción en células vecinas ha permitido postular que las células "dialogan" a través de sus uniones intercelulares. Los cambios de potencial de membrana abarcan zonas más grandes que la propia célula en la que se abre el canal. Estas condiciones permiten especular acerca de si determinados canales pueden ser "compartidos" por más de una célula. Es decir, si la apertura o el cierre de un canal en una célula afecta a las propiedades eléctricas de las células vecinas que no poseen este canal. Otra forma de plantearlo sería la existencia de células "marcapasos" dentro del islote que dirijan la respuesta sincrónica de grandes zonas o, incluso, de todo el islote (más adelante volveremos sobre este punto). Se ha postulado que el cAMP aumenta la comunicación intercelular y que la glucosa y la glibenclámid favorecen el acoplamiento. Todos ellos aumentan el número de uniones en hendidura o uniones comunicantes que pueden observarse. Es decir, existen bastantes evidencias de que el acoplamiento intercelular está sometido a regulación (véase Cap. 17). Sin embargo, se desconoce el papel que el Ca^{2+} y otros mensajeros secundarios pueden ejercer en dicha regulación. Aunque no se sepan los mecanismos que controlan el nivel de acoplamiento intercelular, parece razonable pensar que el islote responde como un todo ante la presencia de glucosa. Esto explicaría la secreción pulsátil de todo el islote coincidente con los períodos de actividad registrados en una sola célula y también las oscilaciones de calcio iónico citosólico que se registran en grandes campos del islote.

No obstante, la significación fisiológica del acoplamiento en el islote no está del todo clara. Los estudios de criofractura y la inyección de colorantes han mostrado que el acoplamiento se da no sólo entre células beta, sino también entre células diferentes desde el punto de vista inmunocitoquímico (por ejemplo entre beta y alfa). Solo una visión integrada de la fisiología del islote como todo permitirá resolver el comportamiento fisiológico de cada una de los tipos presentes en el mismo.

29.5.

RECONSTRUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA. MODELOS (2,4,17,35,37,54,70)

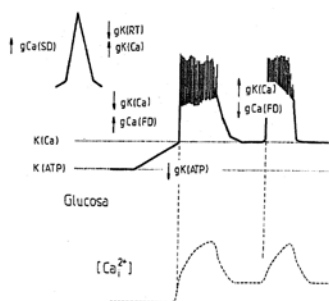


Figura 29.11.

Papel de los canales iónicos en la génesis de la respuesta oscilatoria inducida por glucosa. $g_{K(ATP)}$: conductancia al K^+ dependiente de ATP; $g_{K(Ca)}$: conductancia al K^+ activada por Ca^{2+} ; g_{K_v} : conductancia al K^+ a través del rectificador tardío $g_{Ca(SD)}$: conductancia de bajo umbral al Ca^{2+} ; $g_{Ca(FD)}$: conductancia de alto umbral al Ca^{2+} . V_m : potencial de membrana. $[\text{Ca}^{2+}]_i$: concentración de Ca^{2+} en el citosol. El recuadro muestra un potencial de acción ampliado.

La biofísica de membranas ha cosechado bastantes éxitos generando modelos que, basados en el comportamiento de canales iónicos, expliquen satisfactoriamente las propiedades fisiológicas de la célula objeto de estudio. El paradigma de dicha aproximación es la teoría de Hodgkin y Huxley para explicar el potencial de acción del axón gigante de calamar (cuya descripción detallada se ha visto en el capítulo 9). En la actualidad se dispone de modelos que describen cuantitativamente el comportamiento de las fibras de Purkinje, de epitelios y de neuronas marcapasos, entre otras. También se han iniciado este tipo de estudios con la célula beta. En síntesis, se trata de generar un modelo que sea capaz de: 1) reproducir la respuesta eléctrica típica de la célula beta a la glucosa y otros nutrientes y secretagogos, 2) incorporar los nuevos hallazgos acerca de las propiedades de los canales iónicos, acoplamiento intercelular y homeóstasis del Ca^{2+} y pH intracelular y 3) permitir hacer predicciones, es decir, generar nuevos interrogantes acerca de la fisiología de este tipo celular. Este objetivo general solo se ha cumplido de forma parcial. La célula beta no es solamente una célula que genera respuestas de tipo oscilatorio, con ocurre con ciertas neuronas, sino que también presenta otras formas de respuesta (descarga repetitiva, modulación de frecuencia, activación bifásica), posee ritmos lentos superpuestos al oscilatorio fase silente y fase activa, los potenciales de acción no son constantes en sus características, sino irregulares ⁽⁸¹⁾, las células varían el grado de acoplamiento a lo largo de la respuesta, etc. Se trata por lo tanto de un modelo complejo. Quien desee abundar en los modelos puede dirigirse a la bibliografía, no obstante, también puede avanzar con la versión simplificada que ofrece en la Figura 29-11. Dicha figura contiene la especificación de las permeabilidades implicadas en cada momento. Para generar una respuesta de estas características deben incluirse no solo las propiedades de los canales iónicos sino también la homeóstasis del Ca^{2+} y del pH intracelular, por lo tanto el modelo contiene también predicciones. Por ejemplo, 1) el Ca^{2+} aumenta en presencia de glucosa y tiene que oscilar siguiendo el ritmo de las fases activas y fases silentes (en el apartado 29.6 analizaremos este punto). Existen indicaciones de que esta predicción se cumple. Mediante la utilización de electrodos sensibles a iones se ha podido medir el Ca^{2+} en el espacio restringido que rodea a las células y se ha observado que fluctúa. Esta es otra prueba de sincronismo en las células del islote. Más recientemente se ha conseguido registrar oscilaciones de Ca^{2+} citosólico cuyas características coinciden con las que se esperarían del modelo.

La secuencia en la que las permeabilidades iónicas participan en la génesis de la actividad eléctrica inducida por concentraciones supraestimuladoras de glucosa (por ejemplo, la que se alcanza en sangre después de una comida) sería la siguiente:

1) La entrada y metabolización de glucosa aumenta el ATP intracelular con lo que se *bloquea el canal de K* dependiente de ATP. Desde hace más de una década se sabe que uno de los efectos más inmediatos de la glucosa es disminuir la permeabilidad al K^+ . La disminución de la permeabilidad al K^+ es la causa de la despolarización inicial.

2) El potencial de membrana se sitúa en otro nivel a partir del cual se inicia una secuencia responsable del patrón oscilatorio y que se puede descomponer en oscilaciones lentas (segundos) entre dicho potencial y un potencial de meseta y ráfagas de potenciales de acción sobre el potencial de meseta (cada ráfaga contiene espigas o potenciales de acción y cada espiga dura 50-100 ms).

2.1) La despolarización que inicia una oscilación lenta se debería a la disminución de la permeabilidad al K^+ activada por Ca^{2+} (K_{Ca}) y a la apertura de canales de Ca^{2+} de bajo umbral (SD).

2.2) El potencial de membrana alcanzado en la meseta es suficiente como para activar canales de Ca^{2+} de alto umbral (FD) y de canales de K^+ (K_v y K_{Ca}), lo que genera ráfagas de potenciales de acción. Se trata de espigas de Ca^{2+} , es decir, la despolarización se debe a la entrada de Ca^{2+} y la repolarización a la salida de K^+ . En la repolarización de las espigas podrían participar tanto en el rectificador tardío como el canal de K^+ activado por Ca^{2+} ⁽⁴¹⁾. No hay que olvidar que los canales de Ca^{2+} de alto umbral (FD) no se inactivan o se inactivan muy lentamente, por lo que pueden abrirse una y otra vez, generando descargas repetitivas o ráfagas. Durante todo este período (fase activa) está entrando Ca^{2+} dentro de la célula.

2.3) El aumento del Ca^{2+} citosólico produce dos efectos sobre permeabilidad de la membrana celular (aparte de los efectos sobre los mecanismos del acoplamiento excitación-secreción que se describen más adelante). Por una parte inactiva el propio canal de Ca^{2+} lo que hace que las espigas sean cada vez más lentas y más pequeñas a lo largo de una ráfaga y por otra, se alcanza un punto en el que se activa el canal K_{Ca} lo que repolariza la membrana y se instala una fase silente. Durante esta fase silente los mecanismos de amortiguación de Ca^{2+} se encargan de disminuir su concentración hasta los niveles de reposo y puede iniciarse un nuevo ciclo. Este proceso se repite de forma indefinida en presencia de glucosa en el rango de 10 a 20 mM.

3) El aumento de la glucosa a valores superiores a 20 mM inhibiría fuertemente al canal K_{Ca} por lo que desaparece la actividad oscilatoria y la célula descarga de forma ininterrumpida. Cuando la concentración de glucosa extracelular disminuye hasta los valores típicos de los períodos interpandriales (aprox. 3-5 mM) hay un aumento de la permeabilidad al K^+ mediadas por los canales K_{ATP} y de K_{Ca} y el potencial de membrana vuelve a su valor en reposo.

Cada célula aislada contiene la dotación de canales necesarios para generar este proceso, sin embargo, solo se produce cuando se acoplan alrededor de 50-100 células. Es decir, el modelo debe incluir la comunicación intercelular. Sin embargo, es aún poco lo que se sabe de la regulación de las uniones en hendidura en la célula β como para postular su papel en un modelo.

Por otra parte otros aspectos de la actividad eléctrica no son explicados por el modelo. El modelo no explica todas las observaciones realizadas, pero tampoco las excluye. A medida que aumenta el conocimiento de los mecanismos se podrán construir modelos más completos.

29.6.

CALCIO IÓNICO INTRACELULAR Y SEGUNDOS MENSAJEROS

29.6.1. Homeóstasis del Ca^{2+} citosólico (50,51,52,53,70,77,88,89,90)

El papel relevante que juega el calcio en el acoplamiento excitación-secreción ha quedado demostrado de forma fehaciente a lo largo de todo el Capítulo. La apertura de canales de calcio en la membrana plasmática provoca la entrada masiva de calcio arrastrado por el gradiente de concentración (> 4 órdenes de magnitud) y el potencial de membrana. Puesto que el calcio iónico citosólico es la señal que desencadena el proceso de exocitosis, el estudio de la homeóstasis intracelular del calcio es de vital importancia para conocer los pasos siguientes en la cascada de acontecimientos que acoplan la excitación a la secreción. El papel del calcio en la secreción de insulina está documentado no solamente por los registros de potenciales de acción y de corriente de calcio, sino también por la medición directa del Ca^{2+} intracelular. Mediante la utilización de sondas fluorescentes que modifican sus propiedades de absorción y/o emisión en función de la concentración de Ca^{2+} como por ejemplo quin-2, fura-2 o indo-1 puede seguirse la evolución del calcio intracelular, así como hacer una estimación de sus valores en reposo (véase Cap. 25).

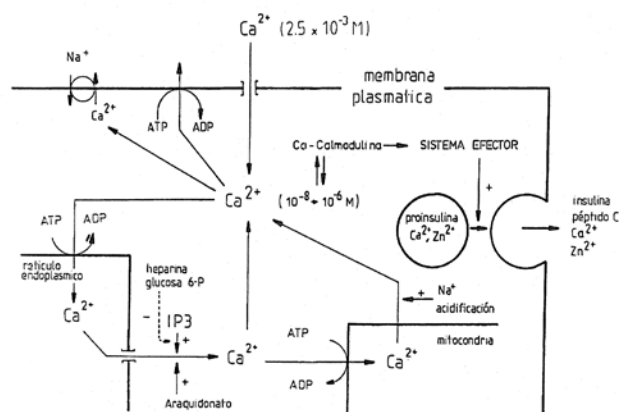


Figura 29.12.
Homeóstasis del Ca^{2+} intracelular.

La concentración aproximada de Ca^{2+} que se ha estimado en el citosol de la célula β en reposo está en el intervalo detectado en otras células, es decir entre 50 y 200 nM. La concentración de Ca^{2+} en el citosol está regulada finamente no sólo por los sistemas de transporte localizados en la membrana plasmática sino también por los mecanismos de transporte presentes en la membrana del retículo endoplásmico, mitocondrias y, probablemente, gránulos de secreción. La Figura 29-12 esquematiza los mecanismos más importantes y que son:

- 1) Entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular a través de los canales de calcio estudiados anteriormente.
- 2) Extrusión de calcio hacia el espacio extracelular. Mediante, a) una bomba de Ca^{2+} que depende de Mg^{2+} , consume ATP y se activa por Ca^{2+} por el que posee una alta afinidad ($K_m = 0.1-0.5 \mu\text{M}$) y opera, por lo tanto, en condiciones fisiológicas y b) un intercambiador $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ conducido por el gradiente de Na^+ y el potencial de membrana (véase Caps 5 y 6).
- 3) Reservorios intracelulares: retículo endoplásmico, mitocondrias y gránulos de secreción.

RETÍCULO ENDOPLÁSMICO Este orgánulo es el principal reservorio de calcio intracelular. El sistema transportador de calcio de microsomas de insulinoma es más potente que el del hígado, posee una alta capacidad para acumular calcio y mantener niveles estacionarios de Ca^{2+} extramitocondrial en el intervalo fisiológico (0.1-1 μM). El sistema de transporte depende de la presencia de K^+ y es activado por oxalato, consume ATP y posee una alta afinidad por Ca^{2+} ($K_m = 1.5 \mu\text{M}$). *Es decir el retículo endoplásmico se convierte en un concentrador de Ca^{2+} .*

La membrana del retículo endoplásmico en otras preparaciones biológicas posee mecanismos de liberación de calcio activados por productos de la hidrólisis de inositolfosfátidos, es decir, IP_3 (inositol-1,4,5, trifosfato) y por araquidonato. La acción del IP_3 es inhibida por heparina y por glucosa-6-fosfato. Como este último es un metabolito generado por la glucosa se postula que podría determinar el fin de la primera fase de secreción².

En un segundo período la liberación de Ca^{2+} por el retículo endoplásmico se debería al araquidonato. Esta hipótesis está respaldada por el curso temporal con que aparecen los dos mediadores. El IP_3 aparece tempranamente (a los pocos segundos) y su aumento en el citosol es transitorio. El araquidonato aparece más tardíamente y su concentración se mantiene a un nivel estacionario.

MITOCONDRIAS Poseen una alta capacidad de amortiguamiento del Ca^{2+} citosólico: consiguen bajar su concentración hasta valores del rango de 0.5-1 μM . La bomba mitocondrial opera entre 0.2 y 3 μM . No se sabe que se alcancen concentraciones superiores a 1 μM en el citosol. Sin embargo, esto podría deberse a la dificultad para resolver transitorios muy rápidos e intensos de Ca^{2+} citosólico, ya que las sondas fluorescentes que se utilizan para medirlo son también quelantes y no operan bien para intervalos altos de concentración (utilizando acurina, una proteína sensible al Ca^{2+} que se ha visto en capítulos anteriores, se han registrado actividades iónicas mucho más altas en el interior de fibras musculares). La mitocondria puede operar como un dosificador de Ca^{2+} . La acidificación del citosol y el aumento del Na^+ ($K_m = 4 \text{ mM}$, concentración intracelular 10 mM) actúan como liberadores de Ca^{2+} .

GRÁNULOS DE SECRECIÓN Pueden almacenar Ca^{2+} hasta concentraciones de 60-120 mM. Su membrana es muy impermeable al Ca^{2+} , por lo tanto no participan en la regulación fina a corto plazo del Ca^{2+} . Hay dos argumentos que niegan un papel fisiológico de el Ca^{2+} intragranular. En primer lugar la concentración de calcio libre intragranular es mucho menor que la señalada. Segundo la membrana del gránulo es muy impermeable al Ca^{2+} y en general a los cationes divalentes, como el Zn^{2+} .

PROTEÍNAS QUE UNEN Ca^{2+} . En el citosol, la calmodulina se encuentra a una concentración aproximada de 40 μM y posee una alta afinidad por el Ca^{2+} . Su importancia fisiológica reside en que determina el funcionamiento del sistema efector. El complejo Ca^{2+} -calmodulina refleja el potencial de fosforilación en el citosol. Existen además muchas otras proteínas que enlazan Ca^{2+} (véase Cap. 6), pero no se sabe que participen en la regulación de su actividad citosólica.

FACTORES QUE MODIFICAN EL Ca^{2+} CITOSÓLICO: Hemos visto que la concentración de Ca^{2+} en el citosol está regulado muy finamente y que juega un papel central en la exocitosis y otros procesos de la fisiología celular. ¿Qué sabemos del efecto de los secretagogos sobre el Ca^{2+} citosólico?. En un principio se utilizaron líneas tumorales (RIN m5F, HIT); en dichas líneas se observó que los secretagogos (nutrientes, acetilcolina) aumentaban el calcio citosólico.

Los modelos utilizados para reproducir la conducta oscilatoria del potencial de membrana predicen que el Ca^{2+} citosólico debe oscilar paralelamente. ¿Oscila el Ca^{2+} en el citosol a la frecuencia necesaria para generar la respuesta típica a la glucosa?. Usando técnicas de microfluorimetría ha sido posible detectar un patrón oscilatorio de Ca^{2+} en islotes de Langerhans obtenidos mediante digestión con colagenasa. La figura 29-13 muestra un registro obtenido al exponer el islote a una concentración estimuladora de glucosa (11.1 mM). En este caso la concentración intracelular de Ca^{2+} fue registrada con el indicador fluorescente Indo-1 midiendo la razón de la fluorescencia emitida a 410 y 480 nm. Un cambio en la concentración de glucosa desde niveles no estimulatorios (3 mM) a 11.1 ó 16.7 mM produce un aumento prolongado de la concentración de Ca^{2+} de duración variable, seguido de oscilaciones de la concentración de Ca^{2+} desde un nivel más elevado que en 3 mM glucosa. En presencia de concentraciones superiores de glucosa (> 20 mM) desaparece el patrón oscilatorio. Estos resultados indican que el Ca^{2+} intracelular en la célula β oscila con un curso temporal y un patrón parecido con el de las oscilaciones del potencial de membrana en presencia de glucosa. El hecho de que se hayan podido registrar oscilaciones de Ca^{2+} en un sistema multicelular como es el islote sugiere que este posee extensos dominios en los que las células están acopladas eléctricamente entre sí, produciendo una actividad eléctrica sincrónica. La confirmación

2. La respuesta secretora de la célula β cuando es expuesta a una concentración estimulante de glucosa evoluciona en dos fases: La primera tiene una duración de 2 a 5 min., mientras que la segunda alcanza su estado estacionario a los 20-30 min.

se realizó gracias a dos líneas de evidencia (77): en primer lugar el registro simultáneo de la actividad eléctrica en una célula β pancreática y el calcio citosólico en todo el islote (Fig. 29.13), en estos registros se mostró la exquisita coincidencia que existe entre ambas señales, por otra parte, analizando, mediante técnicas de análisis de imagen la distribución y evolución temporal el calcio citosólico en el islote se observó que las oscilaciones eran sincrónicas en todo el islote (90).

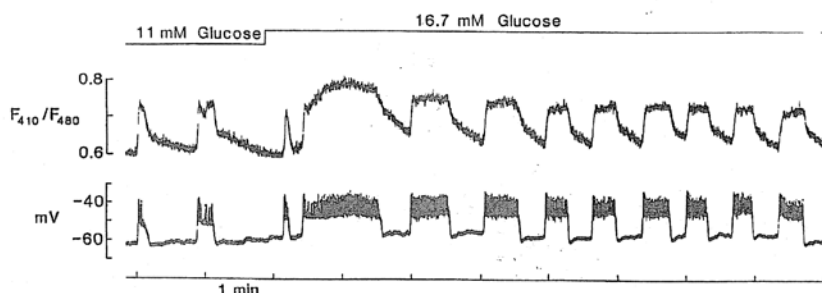


Figura 29.13.

Oscilaciones de Ca^{2+} intracelular simultáneas con la actividad eléctrica en la célula β pancreáticas.

La actividad iónica del Ca^{2+} intracelular fue medida utilizando una sonda fluorescente (Indo-1) cuyas propiedades espectrales dependen de la concentración de Ca^{2+} .

La molécula fue excitada a

350 nm y la emisión se mide a dos longitudes de onda: 410 y 480 nm. En la figura se representa el cociente entre ambas emisiones.

La utilización del cociente entre dos longitudes de onda evita ciertos artefactos como por ejemplo la fotodegradación de la sonda. Por lo tanto, es un buen indicador de la actividad del Ca^{2+} (Tomado de Santos et al. 77).

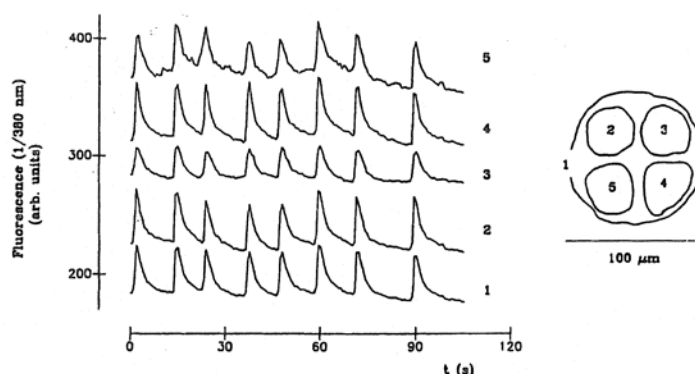


Figura 29.14.

Oscilaciones sincrónicas de calcio citosólico en un islote de Langerhans. El dibujo de la derecha muestra las zonas a las que corresponden los registros de la derecha (Tomada de Valdeolmillos et al, 1993).

Otros secretagogos como la ACh producen un aumento transitorio de corta duración (20-60 s) y sin embargo, potencian la secreción durante periodos de 20 a 30 min (72). Estos resultados sugieren que el Ca^{2+} puede jugar un papel de mensajero "mercurial", como el cartero que entrega una carta que cambia bruscamente la vida de una familia (por ejemplo, la noticia de que van a heredar de un familiar desconocido). La presencia real del cartero ha sido breve, no más allá de unos minutos, sin embargo suficiente como para cambiar profundamente la vida de los miembros de la familia. Asimismo el Ca^{2+} , puede actuar como el cartero, dejando un mensaje en el sistema efector que permanecerá durante un periodo largo, por ejemplo un cambio en la afinidad a los mensajeros que disparan la exocitosis, incluido el propio Ca^{2+} .

La integración de la señal de calcio en el interior de la célula exige la participación de un conjunto armónico de factores: la entrada de calcio desde el "pool" extracelular, la movilización de Ca^{2+} a partir de reservorios intracelulares, la participación de segundos mensajeros como IP_3 , diacilglicerol, cAMP, etc. Si se piensa que las permeabilidades de la membrana van a ser moduladas por algunos de estos mensajeros que a su vez se disparan con la apertura o el cierre de ciertos canales, aumenta la complejidad del problema. Obtener un esquema integrado de las propiedades biofísicas de los canales iónicos de la célula β , de su contribución al acoplamiento estímulo-secreción y de los sistemas que traducen el mensajero a nivel intracelular en una respuesta exocitótica constituye un importante reto para la biofísica y la fisiología celular toda vez que esta célula es el integrador por excelencia del metabolismo de los glúcidos. Y dicha integración la realiza merced a procesos típicamente electrofisiológicos, del tipo de los que suele abordar la neurofisiología.

29.6.2. cAMP (9)

En la célula beta el cAMP no debe considerarse una molécula mensajera esencial sino más bien un modulador de la respuesta secretora inducida por nutrientes. Esta idea se basa en la disociación entre los niveles de cAMP intracelular y la secreción de insulina. Los agentes que aumentan el cAMP (glucagon, forskolina y toxina del cólera) tienen poco o ningún efecto sobre el proceso secretor a concentraciones bajas (2.8 mM) de glucosa. La capacidad del cAMP para potenciar la secreción de insulina es mayor a concentraciones más altas de glucosa. El cAMP induce un aumento en la entrada de Ca^{2+} que puede activar la secreción, bien directamente o bien a través de una activación de la fosforilación de proteínas. Los iniciadores de la secreción producen poco aumento de la síntesis de cAMP, mientras que los potenciadores (hormona y neurotransmisores) generan un aumento mayor.

29.6.3. Productos del metabolismo de los inositolfosfátidos:

Los inositolfosfátidos son componentes de la bicapa lipídica que por acción de la fosfolipasa C pueden ser hidrolizados en inositol-1-4-5-trifosfato (IP_3) y en diacilglicerol. El IP_3 es hidrosoluble y tras la hidrólisis, es liberado al citosol donde interacciona con receptores específicos en el retículo endoplásmico y abre canales de calcio. Induce, por lo tanto, la movilización de calcio intracelular y aumenta la concentración de calcio iónico en el citosol. El diacilglicerol es liposoluble, ejerce su acción de forma más lenta. Tras la hidrólisis de los inositolfosfátidos se desplaza en la fase lipídica de la membrana desde donde ejerce su acción: activa la proteína quinasa C (que en su forma activa se une a la membrana) y genera el ácido araquidónico del que es precursor. El recambio de fosfoinositósidos en las células del islote es acelerado por secretagogos como la glucosa y por neurotransmisores (ACh) y hormonas (CCK-PZ). La activación del recambio de inositolfosfátidos por ACh es independiente de la entrada de Ca^{2+} y del aumento del Ca^{2+} citosólico, mientras que la glucosa precisa Ca^{2+} en el espacio extracelular. El Ca^{2+} citosólico activa la fosfolipasa C. El mecanismo de acción por el que la glucosa y otros nutrientes pueden activar la fosfolipasa C sería el aumento del Ca^{2+} citosólico aunque es probable que actúe a través de otros mecanismos hoy por hoy desconocidos.

29.6.4. Araquidonato

Existen varias rutas para la formación de ácido araquidónico. 1) A partir del diacilglicerol (DAG) por acción de una DAG lipasa, 2) Por desacilación directa de los fosfolípidos por una fosfolipasa A2 y 3) Por acción de una desacilación de fosfolípidos por una fosfolipasa A1 seguida de la acción de una lisofosfolipasa. La glucosa induce un aumento de araquidonato en dos fases, un aumento temprano por acción de la fosfolipasa A2 y un aumento tardío por efecto de la lipasa de diacilglicerol.

Son funciones del ácido araquidónico: 1) Ser precursor de los eicosanoides (prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos reciben este nombre porque contienen 20 átomos de carbono, *eikosi* significa veinte en griego), 2) Promover la liberación del calcio desde el retículo endoplásmico y 3) Otras funciones, como activador de guanilato ciclasa, fosfolipasa C, ATPasa Ca^{2+} dependiente, etc. El papel de estos factores en la célula β pancreática está siendo objeto de estudio.

29.6.5. Proteínas G (34)

Se trata de un mecanismo de acoplamiento que no utiliza segundos mensajeros solubles en el citosol o en la membrana lipídica. Una proteína que enlaza guanilnucleótido (proteína G) acopla la acción de hormonas (galanina, somatostatina) al canal de K^+ dependiente de ATP. Las proteínas G se interconvierten entre una forma inactiva-GDP y una forma activa-GTP (ver Cap. 20). La interconversión es facilitada por agentes hormonales y quizás, por neurotransmisores.

29.7.

A COPLAMIENTO ESTÍMULO-SECRECIÓN

Los hallazgos de los últimos años permiten reconstruir un diagrama de flujo que acople la llegada de la glucosa a la secreción de insulina. La Figura 29-15 muestra esquemáticamente el diagrama. Este esquema es incompleto y no pretende explicar todas las situaciones experimentales, especialmente aquellas que suceden a partir del aumento del calcio citosólico. Sin embargo, explica con bastante fidelidad el comportamiento de la célula β ante aquellos agentes que modifican las permeabilidades iónicas y el calcio intracelular. Es decir, los primeros pasos del acoplamiento estímulo-secreción.

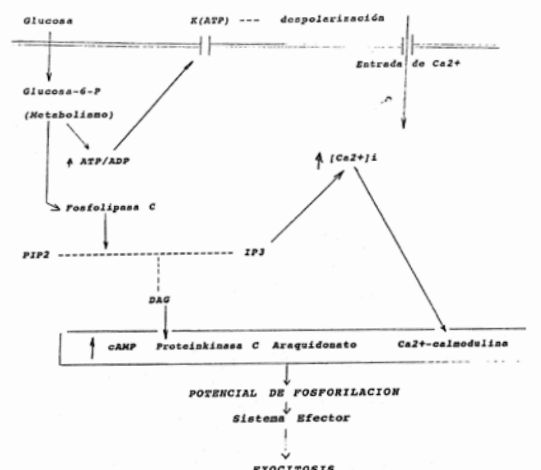


Figura 29.15.

Acoplamiento estímulo-secreción en la célula beta pancreática.

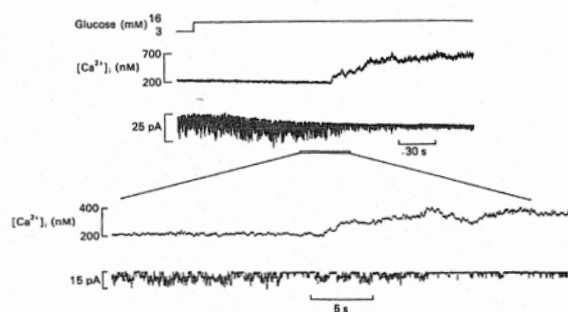


Figura 29.16.

Registro simultáneo de la actividad del canal K(ATP) y del calcio citosólico en la célula beta pancreática.

La Figura 29-16 muestra el efecto de la glucosa sobre la actividad del canal K_{ATP} (registrada mediante patch-clamp) y la concentración de Ca^{2+} en el citosol. El aumento del Ca^{2+} es posterior al cierre del canal K_{ATP} como predecía la teoría expresada.

29.7.1. La señal de calcio para la secreción de insulina:

El registro simultáneo de la actividad eléctrica en una célula beta y del calcio iónico citosólico en la totalidad del islote ha permitido demostrar que las oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ se deben a la actividad eléctrica en ráfagas (77). El hecho de que se hayan podido registrar oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ en un sistema multicelular como es el islote sugiere que este posee extensos dominios en los que la células están acopladas eléctricamente entre sí, produciendo actividad eléctrica sincrónica. En experimentos más recientes en los que se ha registrado la imagen de las oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ en todo el islote se ha podido comprobar que todas las regiones del islote oscilan sincrónicamente (90). Este modo de operación permite que una población heterogénea de células desde un punto de vista de la respuesta individual a la glucosa (82,89) se traduzcan en una respuesta coordinada y homogénea de todas ellas, toda vez que cada célula dispone de los canales iónicos necesarios.

La oscilación de $[Ca^{2+}]_i$ citosólico presenta dos rasgos que difieren de los modelos publicados previamente: a) se trata de una señal cuadrada y no en dientes de sierra, como cabría esperar si el calcio fuese aumentando a lo largo de la ráfaga y b) el aumento de la concentración de glucosa produce un alargamiento de la oscilación y no un aumento en la amplitud de la señal. La única forma de construir una señal cuadrada es poseer sistemas que extruyan calcio y no le dejen rebasar un cierto nivel. Gracias a estos sistemas que permiten que la glucosa no solo aumente sino que disminuya $[Ca^{2+}]_i$, la célula puede construir una oscilación cuya duración es el código para la secreción de insulina. Parece claro que la glucosa utiliza un código de duración. ¿Cuál es el código de otros secretagogos? Los experimentos preliminares con arginina o acetilcolina parecen indicar que estos secretagogos utilizan un código de amplitud. Es decir, que los iniciadores utilizarían un código de duración mientras que los potenciadores codifican con la amplitud de las señales.

29.7.2. El sistema efector (7,12,63)

En el interior del gránulo la insulina se almacena en forma de proinsulina empaquetada en forma cuasi cristalina junto con el ión Zn^{2+} (para revisar los mecanismos de síntesis y almacenamiento se recomienda leer Orci, (7)). El Zn^{2+} es un oligoelemento necesario para la vida y se encuentra en el organismo almacenado en los gránulos de secreción de la célula β pancreática y en determinados terminales peptidérgicos del sistema nervioso central. El Zn^{2+} , que se capta por el gránulo por un mecanismo idéntico al Ca^{2+} es liberado al espacio extracelular junto con el Ca^{2+} durante el proceso exocitótico. La liberación de insulina al medio extracelular se produce por exocitosis, es decir por fusión de la membrana del gránulo con la membrana plasmática y vaciamiento del contenido al espacio extracelular (ver Cap. 27).

Es poco lo que se sabe de los mecanismos por los que el aumento del calcio y de otros mensajeros se traduce en la activación de la maquinaria que dispara la exocitosis. Los mecanismos moleculares son complejos y probablemente, involucran a una larga serie de proteínas calcio-dependientes como calmodulina, proteína quinasa C, sinexina, gelsolina y varias proteínas de citoesqueleto.

Una de las principales acciones del complejo calcio-calmodulina y del resto de mensajeros es alterar el estado de fosforilación de las proteínas celulares. Por mecanismos que se desconocen en detalle se induce la fusión de los gránulos con la membrana plasmática.

La exocitosis es una de las partes del ciclo vesicular. Los capítulos 27 y 28 estudian en detalle dicho proceso. En la célula beta pancreática se han descrito la mayor parte de las proteínas que participan en la maquinaria exocitótica: VAMP, SNAP-25, sintaxina, munc-18, sinaptobrevina, sinaptofisina, etc. (95). En los próximos años debe esclarecerse el diagrama de flujo que pueda incluir las proteínas descritas, los segundos mensajeros y los cambios del sistema efector.

29.8.**EL ISLOTE COMO ÓRGANO NEUROENDOCRINO (4,11,34,39,45,61,72)**

El islote es un conjunto de varios tipos celulares con una alta organización funcional y estructural. Desde su descripción por Langerhans se sabe que está profusamente innervado y desde el punto de vista humoral está sometido a la modulación por parte de hormonas de origen gastrointestinal (eje entero-insular) y otras. Los niveles de organización en que se estructura son: a) control autocrino (por la propia célula β) y paracrino (por tipos celulares cercanos: secretores de glucagón, somatostatina, polipéptido pancreático), b) influencias de tipo endocrino (gastrina, colecistoquina-pancreozimina, TRH, VIP, bombesina, péptidos opiáceos, neurotensina, la mayor parte de ellos péptidos neuroactivos, etc.) y c) control nervioso (colinérgico, adrenérgico y peptidérgico).

EJE ENTEROINSULAR: La respuesta a la glucosa oral es más potente que la equivalente a la glucosa intravenosa. Esto sugiere un efecto potenciador del tracto gastrointestinal en la secreción de la célula β . En un principio se pensó que se trataba de una respuesta hormonal con la participación de gastrina y GIP. En la actualidad se considera más importante la regulación nerviosa, el origen sería los glucorreceptores presentes en la cavidad oral, estómago e intestino que alcanzan el sistema nervioso central a través del nervio vago.

REGULACIÓN NERVIOSA La existencia de mecanismos de control nerviosos se conoce desde que el gran fisiólogo francés Claude Bernard observó en 1848 la aparición de hiperglucemia tras el pinchazo de la base del IV ventrículo (la "picadura diabética"). A pesar del tiempo transcurrido aún se desconoce el mecanismo y el significado de la regulación nerviosa de la secreción de insulina. Se supone que debe estar conectado con la conductancia alimentaria y la obesidad.

MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA Al tratarse de una célula excitable es lógico pensar que una de las formas de regulación fisiológicas puedan ser la modulación de permeabilidades iónicas. En este sentido se han ensayado algunos neurotransmisores sobre la actividad eléctrica. La acetilcolina y los agentes de tipo muscarínico potencian la secreción de insulina. La potenciación de la secreción viene acompañada por un aumento transitorio de la frecuencia de espigas, sin embargo las catelaminas y la histamina producen una inhibición transitoria de la actividad eléctrica. De algunos moduladores se empieza a conocer el mecanismo de acción, por ejemplo somatostatina y galanina son neuropéptidos hiperglucemiantes que activan canales de K^+ dependientes de ATP al parecer vía una proteína G sensible a la toxina pertussis. A la luz del esquema presentado en la Figura 29-15 y de los datos comentados previamente, el lector debe ser capaz de seguir el mecanismo y el resultado de aquellos agentes que modifican las permeabilidades iónicas. Por ejemplo ¿Cuál sería el efecto de los activadores del canal de Ca^{2+} sobre la secreción de insulina? ¿Y el de los bloqueadores del canal K_{ATP} ?

29.9.

RESUMEN:

El acoplamiento excitación-secreción en la célula beta pancreática se produce gracias a una perfecta integración de mecanismos metabólicos y permeabilidades iónicas de la membrana. El estímulo principal para la secreción de insulina es la glucosa. La glucosa se metaboliza en el citosol y genera ATP y otros mensajeros. Como consecuencia del aumento de ATP se cierra el canal K_{ATP} . También se bloquea el canal K_{Ca} (se desconoce el mecanismo exacto). El cierre de los canales de K^+ despolariza la membrana y en consecuencia abre canales de Ca^{2+} . La apertura de dichos canales genera una entrada masiva de Ca^{2+} y consecuentemente un aumento del Ca^{2+} citosólico. Este aumento del Ca^{2+} intracelular es el principal factor en la inducción de la exocitosis.

La respuesta exocitótica exige la participación de otros mecanismos. El más importante es la génesis de productos de hidrólisis de inositoltrifosfatos por acción de la fosfolipasa C, el inositoltrifosfato (IP_3) y el diacilglicerol. IP_3 libera calcio del retículo endoplásmico que a su vez activa la fosfolipasa C. El diacilglicerol es un activador de la proteína quinasa C y un precursor del ácido araquidónico. La resultante de todos estos procesos es un aumento del Ca^{2+} y del potencial de fosforilación. A través de un mecanismo del que sólo se conocen algunos aspectos y que posiblemente sea múltiple se induce la fusión de los gránulos de secreción con la membrana plasmática y se vacía el contenido de los mismos al espacio extracelular.

La célula beta está sometida al control humoral (autocrino, paracrino y endocrino) y nervioso. Se conoce el mecanismo a través del que actúan algunos de estos moduladores. Es de esperar que en un futuro próximo dispongamos de un esquema más completo que explique no solamente la acción de la glucosa y otros nutrientes sino también de los agentes que modulan la secreción de insulina (neurotransmisores y hormonas).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ashcroft, F.M. (1978). Adenosine 5'-triphosphate sensitive potassium channels. *Ann. Rev. Neurosc.* **11**: 97-118.
2. Ashcroft, F.M., Rorsman, P. (1990) Electrophysiology of the Pancreatic β -cell. *Prog. Biophys. mol. Biol.* **54**, 87-143.
3. Atwater, I., Carroll, P. y Li, M.X. 1988. Electrophysiology of the pancreatic B-cell. En: *Molecular and cellular Biology of Diabetes*. Alan R. Liss, Inc. New York.
4. Atwater, I., Rojas, E. y Soria, B. 1986, *Biophysics of the Pancreatic B-cell*, Plenum Press, New York.
5. Bliss, M. 1987, *The discovery of insulin*. MacMillan Press, Hong Kong.
6. Henquin, J.C y Meissner, H.P. 1984. Significance of ionic fluxes and changes in membrane potential for stimulus-secretion coupling in pancreatic B-cells, *Experientia* **40**: 1043-1052.
7. Orci, L. 1985. The insulin factory: a tour of plant surroundings and a visit to assembly line. *Diabetologia* **28**: 528-546.
8. Ozawa, S. y Sand, O. 1986. Electrophysiology of excitable endocrine cells *Physiol. Rev.* **66**: 887-952.
9. Prentki, M., Matchinsky, F.M. 1987. Ca^{2+} , cAMP and Phospholipid derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion. *Physiol. Rev.* **67**: 1185-1248.
10. Prentki, M y Wollheim, C.B. 1984. Cytosolic free Ca^{2+} in insulin secreting cells and regulation by isolated organelles. *Experientia* **40**: 1052-1060.
11. Soria B (1995) *Physiology and Pathophysiology of the Pancreatic Islets*. Plenum Press New York.
12. Wollheim, C.B., Sharp, W.G. 1981. Regulation of insulin release by calcium. *Physiol. Rev.* **61**: 914-973.

REFERENCIAS ESPECÍFICAS

13. Ashcroft, F.M., Harrison, D.E. y Ashcroft, S.J.H. 1984. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic cells. *Nature* **312**, 446-448.
14. Ashcroft, F.M., Harrison, D.E. y Ashcroft, S.J.H. 1988 Properties of single potassium channels modulated by glucose in rat pancreatic β -cells. *J. Physiol.* **400**- 501-529.
15. Ashcroft, F.M, Kakei, M, Kelly, R. Sutton R. 1987. ATP-sensitive K^+ channels in human isolated pancreatic B-cells. *FEBS Lett.* **215**, 9-12.
16. Ashford, M.L.J., Sturgess, N.C., Cook, D.L. y Hales, C.N. (1986). K-channels in an insulin secreting cell line: effects of ATP and sulphonylureas. En *Biophysics of the Pancreatic B-cell* (I. Atwater, E. Rojas y B. Soria, eds) pp. 69-76. Plenum Press, New York.
17. Atwater, I., Dawson, C. M., Eddlestone, G. y Rojas, E. 1981. Voltage noise measurements across the pancreatic B-cell membrane: calcium channel characteristics. *J. Physiol* **314**, 195-212.
18. Atwater, I., Goncalves, A., Herchuelz, a., Lebrun, P. Malaisse, W.J. Rojas, E. y Scott, A. 1984. Cooling dissociates glucose-induced insulin release from electrical activity and cation fluxes in rodent pancreatic islets. *J. Physiol.* **348**, 615-629.
19. Chay, T.R. 1985. Glucose response to bursting-spiking pancreatic β -cells by a barrier kinetic model. *Biol. Cyber.* **52**, 339-349.
20. Cook, D.L., Ikeuchi, M., Fujimoto, W.Y. 1984. Lowering of pH inhibits Ca^{2+} -activated K^+ channels in pancreatic B-cells. *Nature* **311**, 269-291.
21. Cook, D.L. y Hales, C.N. 1984 Intracellular ATP directly blocks K^+ channels in pancreatic B-cells. *Nature*, **311**, 291-293
22. Dean, M.J., Matthews, E.K. 1968. Electrical activity in pancreatic islet cells. *Nature* **219**, 389-390.
23. Dean, P.M. y Matthews, E. K. 1970. Glucose-induced electrical activity in pancreatic islet cells. *J. Physiol.* **210**, 265-295.
24. Deam P.M., Mathews, E.K. y Sakamoto Y. 1975. Pancreatic islet cells: Effects of monosaccharides, glycolytic intermediates and metabolic inhibitors on membrane potential and electrical activity. *J. Physiol.* **246**, 459-478.
25. Dunne, M.J. Petersen, O.H. 1986. Intracellular ADP activates K^+ channels that are inhibited by ATP in an insulin-secreting cell line *FEBS Lett* **202**, 59-62.
26. Eddelstone, G.T., Goncalvez, A., Bangham, J.A: y Rojas, E. 1984. Electrical coupling between cells in islets of Langerhans from mouse. *J. Membrane Biol* **77**, 1-14.
27. Ferrer, R., Atwater, I., Omer, E.M., Goncalvez, A., Croghan, P.C. y Rojas, E. 1984. Electrophysiological evidence for the inhibition of potassium permeability in pancreatic B-cells by glibenclamide. *Quart. J. Exp. Physiol.* **69**, 831, 839.
28. Ferrer, R., Soria B., Dawson, C.M. Atwater, I. y Rojas, E. 1985. Effects of Zn^{2+} on glucose-induced electrical activity and insulin release mouse pancreatic islets. *Amer. J. Physiol.* **246**, C520-C529.
29. Ferrer, R., Sala, S., Sanchez-Andrés J.V y Soria, B. 1985. Further evidence that Zn^{2+} blocks voltage-dependent calcium channels in the mouse pancreatic B-cell. *Biochem. Soc. Trans.* **13** (4), 680-681.
30. Findlay, I. 1987. The effects of magnesium upon adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in a rat insulin-secreting cell line. *J. Physiol.* **391**, 611-629.
31. Findlay, I., Dunne, M. 1986 ATP maintains ATP-inhibited channels in an operational state. *Pflugers Arch.* **407**, 328-240.
32. Findlay, I., Dunne, M.J. Ullrich, S., Wollheim, C.B. y Petersen, O.H. 1985. Quinine inhibits Ca^{2+} -independent K^+ channels whereas tetraethylammonium inhibits Ca^{2+} -activated K^+ channels in insulin secreting cells. *FEBS LETT.* **185**, 4-8.
33. Fishman, M.C., 1976. Membrane potential in juxtaglomerular cells. *Nature* **260** 542-544.
34. Fosset, M., Schmid-Antomarchi, H., Weille, J.R. de Lazdunski, M., 1988. Somatostatin activates glibenclamide-sensitive and ATP-regulated K channels in insulinoma cells via a G-protein. *FEBS Lett* **242**, 94-96.
35. Henquin, J.C., 1978 D-glucose inhibits potassium efflux from pancreatic islets cells. *Nature* **291**, 291-293.
36. Henquin, J.C y Meissner, H.P. 1984 Significance of ionic fluxes and changes in membrane potential for stimulus-secretion coupling in pancreatic B-cells, *Experientia* **40**: 1043-1052.
37. Himmel, D.M. Chay, T.R. 1987 Theoretical studies on the electrical activity of pancreatic B-cells as a function of glucose *Biophys. J.* **51**, 89-107.
38. Hiriart, M., Matteson, D.R., 1988. Na channels and two types of Ca channels in rat pancreatic B-cells identified with the reverse hemolytic plaque assay. *J. Gen. Physiol.* **91**, 617-639.
39. Jeanrenaud, B. 1985 An hypothesis on the aethiology of obesity:dysfunction of the central nervous system as a primary cause. *Diabetologia* **28**, 502-513.
40. Kidokoro, Y., 1975. Spontaneous Ca action potentials in a clonal pituitary cell line and their relationship to prolactin secretion. *Nature* **258**, 741-742.
41. Kukuljan, M., Li, M.Y., Atwater, I. (1990) Characterization of potassium channels in pancreatic β cells from ob/ob mice. *FEBS Lett.* **266**, 105-108.
42. Latorre, R. y Miller, C., 1983 Conduction and selectivity in potassium channels. *J. Membr. Biol.* **71**, 11-30.

43. Lopez-Barneo, J. y Armstrong, 1983 C.M. Depolarizing response of rat parathyroid cells to divalent cations. *J. Gen. Physiol.* **82**, 269-294.
44. Malaisse, W.J. y Boscher, C., 1977. Calcium antagonists and islet function IX. Effect of nifedipine. *Horm Res* **8**, 203-209.
45. Marqués, A., Ferrer, R., Ripoll, C., Soria, B. 1986 Electrophysiological evidence for histaminergic modulation of pancreatic beta cell function. *Adv. Exp. Med. Biol.* **211**, 359-365.
46. Meda, P., Perrelet, A. y Orci, L. 1984. Gap junctions and cell-to-cell coupling in endocrine glands. *Modern cell biology* **3**: 131-196.
47. Meda, P., Santos, R., Atwater, I. 1986. Direct identification of electrophysiologically monitored cells within intact mouse islets of Langerhans. *Diabetes*, **35**, 232-236.
48. Meissner, 1976. Electrophysiological evidence for coupling between beta cells of pancreatic islets. *Nature* **262**, 502-504.
49. Misler, S., Falke, L.C., Gillis, K., McDaniel, M.L. 1986. A metabolite regulated potassium channel in rat pancreatic B-cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**, 7119-7123.
50. Nadal, A., Contreras, D., Soria, B., Valdeolmillos, M. 1992. Simultaneous measurements of $[Ca^{2+}]_i$ and K(ATP) channel activity in single dissociated mouse pancreatic B-cells. *J. Physiol.* **446**, 132P.
51. Nadal, A., Soria, B., Valdeolmillos, M. 1993. Multicellular synchronous oscillations in pancreatic B-cells. En: *Pacemaker activity and intercellular communication. Common mechanisms in diverse systems?* J.D. Huizinga, Ed. CRC Press. pp. 285-296.
52. Nadal, A., Valdeolmillos, M., Soria, B. 1994. $[Ca^{2+}]_i$ changes induced by tolbutamide in single pancreatic islets. En: *"Frontiers in B-Cell Research"* (P. Flatt; S. Lenzen eds.) Smith-Gordon and Co. Ltd. pp. 237-241.
53. Nadal, A., Valdeolmillos, M., Soria, B. (1994) Metabolic regulation of $[Ca^{2+}]_i$ in mouse pancreatic islets of Langerhans. *Am. J. Physiol.* **267**: E769-E774.
54. Neher, E. y Sakmann, B. 1976. Single channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* **260**, 799-802.
55. Nilsson, T., Zwiler, J., Boynton, A.L. y Berggren, P.O. 1988. Heparin inhibits IP3-induced Ca^{2+} release in permeabilized pancreatic B-cells. *FEBS Lett* **229**, 211-214.
56. Nowycky, M.C., Fox, A.P. y Tsien, R.W. 1985. Three types of neuronal calcium channels with different calcium agonist sensitivity. *Nature* **316**, 440-443.
57. Ohno-Shosaku, T., Zunkler, B.J., Trube, G. 1987. Dual effect of ATP on K^+ currents of mouse pancreatic B-cells. *Pflugers Arch.* **408**, 133-138.
58. Orci, L. 1985. The insulin factory: a tour of plant surroundings and a visit to assembly line. *Diabetologia* **28**: 528-546.
59. Plant, T. 1988. Na^+ currents in cultured mouse pancreatic B-cells. *Pflugers Arch.* **411** -429-435.
60. Plant, T. 1988. Properties and calcium-dependent inactivation of calcium currents in cultured mouse pancreatic B-cells. *J. Physiol.* **404**, 731-747.
61. Palafox, I., Sanchez-Andrés, J.V., Sala, S., Ferrer, R., Soria, B. 1986. Muscarinic receptors and the control of glucose-induced electrical activity in the pancreatic beta cell. *Adv. Exp. Med. Biol.* **211**, 351-358.
62. Perez-Armendariz, M. y Atwater, I., 1986. Glucose-evoked changes in K^+ and Ca^{2+} in the intercellular spaces of the mouse islet of Langerhans. *Adv. Exp. Med. Biol.* **211**, 31-51.
63. Pollard, H.B., Burns, A.L. y Rojas, E. 1988. A molecular basis for synaexin-driven calcium-dependent membrane fusion. *J. Exp. Biol.* **136**, 267-286.
64. Ribalet, B., Ciani, S., 1987. Regulation by cell metabolism and adenine nucleotides of a K channel in insulin secreting B cells (RIN m5F) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 1721-1725.
65. Ribalet, B., Eddlestone, G.T., Ciani, S. 1988. Metabolic regulation of the K (ATP) and the Maxi-K(V) channel in the insulin secreting RIN m5F cell. *J. Gen. Physiol.* **92**, 219-237.
66. Rorsman, P., Trube, G., 1986. Calcium and delayed potassium currents in mouse pancreatic B-cell under voltage clamp conditions. *J. Physiol.* **374** 531-550.
67. Rosario, L.M., 1985. Differential effects of the K^+ channel blockers apamin and quinine on glucose-induced electrical activity in pancreatic B-cells from a strain of ob/ob (obese) mice. *FEBS Lett* **188**, 302-306.
68. Rosario, L.M., Atwater, I. y Rojas E. 1985. Membrane potential measurements in islets of Langerhans from ob/ob obese mice suggest an alteration in Ca^{2+} -activated K^+ permeability. *Quart. J. Exp. Physiol* **70**, 137-150.
69. Rosario, L.M. I. Atwater y A. Scott, 1986. Pulsatile insulin release and electrical activity from single ob/ob mouse islets of Langerhans. *Adv. Exp. Med. Biol.* **211**, 413-425.
70. Rosario, L.M., Soria, B., Feuerstein, G., Pollard, H.B. 1989. Voltage-sensitive calcium flux into bovine chromaffin cells occurs through dihydropyridine-sensitive and dihydropyridine- and w-conotoxin-insensitive pathways *Neuroscience* **29**, 735-747
71. Sala, S., Matteson, D.R. 1990. Single-channel recordings of two types of calcium channels in rat pancreatic B-cells. *Biophys. J.* **58**, 567-571.
72. Sanchez-Andrés, J.V., Ripoll, C., Soria, B. 1988. Evidence that muscarinic potentiation of insulin release is initiated by an early transient calcium entry. *FEBS Lett.* **231**, 143-147
73. Sanchez-Andrés J.V., Soria, B. 1991. Muscarinic inhibition of the pancreatic B-cell. *Eur. J. Pharmacol.* **205**, 89-91.

74. Sanchez-Andrés, J.V., Nadal, A., Martin, F., Soria, B. 1993. Sequential effects of muscarinic agonists on glucose-induced electrical activity and cytosolic $[Ca^{2+}]_i$ in the pancreatic B-cell. En "Frontiers in B-Cell Research" (P. Flatt; S. Lenzen eds.) Smith-Gordon and Co. Ltd. pp. 353-358.
75. Sanchez-Andrés, J.V., Soria, B. 1993. The pancreatic B-cell as a voltage-controlled oscillator. *Lecture Notes in Computer Science* 686. *New Trends in Neural Computation* (J. Mira, J. Cabestany, A. Prieto eds.). Springer Verlag. pp.37-42.
76. Santos, R.M. y Rojas, E. 1987 Evidence for modulation of cell-to-cell electrical coupling by cAMP in mouse islets of Langerhans. *FEBS Lett.* **220**, 342-346.
77. Santos RM, Rosario LM, Nadal A, Garcia-Sancho J, Soria B, Valdeolmillos M 1991. Widespread synchronous $[Ca^{2+}]_i$ oscillations due to bursting electrical activity in single pancreatic islets. *Pflügers Arch. (Eur. J. Physiol.)* **418**, 417-422.
78. Satin, L.S., Cook, D.L. 1988. Evidence for two calcium currents in insulin secreting cells. *Plügers Archiv.*, **411**, 401-409.
79. Sherman, A., Rinzel, J. y Keizer, J. 1988. Emergence of organized bursting in clusters of pancreatic B-cells by channel sharing. *Biophys. J.* **54**, 411-425.
80. Soria, B. (1992) Calcio citosólico y liberación de insulina. *An. Real Acad. Nac. Med.* **109**, 739-757.
81. Soria, B., Ferrer, R. 1986. Graded spike electrogenesis in mouse pancreatic B-cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* **211**, 235-246.
82. Soria, B., Chanson, M., Giordano, E., Bosco, D., Meda, P. 1991. Ionic channels in glucose responsive and unresponsive B-cells. *Diabetes* **40**, 1069-1078.
83. Soria, B., Nadal, A., Martin, F., Sanchez-Andrés, J.V. 1994. $[Ca^{2+}]_i$ code for glucose-induced insulin release in mouse pancreatic islets of Langerhans. En "Frontiers in B-Cell Research" (P. Flatt; S. Lenzen eds.) Smith-Gordon and Co. Ltd. pp. 229-235.
84. Tabares, L. y Lopez-Barneo, J. 1986 Calcium action potentials in cultures adrenocortical cells. *Pflügers Arch.* **407**, 163-165.
85. Tischler, A.S., Dichter, M.A., Biales, B., Delellis, R.A. y Wolfe, H. 1976. Neural properties of cultured human endocrine tumor cells of proposed neural crest origin. *Science* **192**, 902-904.
86. Trube, G., Rorsman, P., Ohno-Shosaku, T. 1986. Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent K channel in pancreatic B-cell. *Pflügers Arch.* **407**, 493-499.
87. Tsien, R.Y., Rink, T.J. y Poenie, M. 1985. Measurement of cytosolic free Ca^{2+} in individual small cells using fluorescent microscopy with dual excitation wavelengths. *Cell calcium* **6**, 145-157.
88. Valdeolmillos, M., Santos, R.M., Contreras, D., Soria, B., Rosario, L.M. 1989. Glucose-induced oscillations of intracellular Ca^{2+} concentration resembling bursting electrical activity in single mouse islets of Langerhans. *FEBS Lett.* **259**, 19-23.
89. Valdeolmillos, M., Nadal, A., Contreras, D., Soria, B. 1992. The relationship between glucose-induced K(ATP) channel closure and the rise in $[Ca^{2+}]_i$ in single mouse pancreatic islet cells. *J. Physiol.* **455**, 173-186.
90. Valdeolmillos, M., Nadal, A., Soria, B., García-Sancho, J. (1993) Fluorescence digital image analysis of glucose-induced $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in mouse pancreatic islet of Langerhans. *Diabetes* **42**: 1210-1214.
91. Weille, J. de, Schmid-Antomarchi, H., Fosset, M., Lazdunski, M. 1988. ATP-sensitive K channels that are blocked by hypoglycemia-inducing sulfonylureas in insulin-secreting cells are activated by galanin, a hyperglycemia-inducing hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **85**, 1312-1316.
92. Wolheim, C.B. y Pozzam, T. 1984. Correlation between cytosolic free Ca^{2+} and insulin release in an insulin-secreting cell line. *J. Biol. Chem.* **259**, 2262-2267.
93. Wolf, B.A., Colca J.R., Comens, P.G., Turk, J. y McDaniel, M.L. 1986. Glucose 6-phosphate regulates Ca^{2+} steady state in endoplasmic reticulum of islets. *J. Biol. Chem.* **261**, 16284-16287.
94. Zünckler, B.J., Trube, G. y Ohno-Shosaku, T. 1988. Forskolin-induced block of delayed rectifying K^+ channels in pancreatic B-cells is not mediated by cAMP. *Pflügers Arch.* **411**:613-619
95. Martín, F., Moya, F., Gutiérrez, L. M., Reig, J. A., Soria, B. 1995. Role of syntaxin in mouse pancreatic beta cel.. *Diabetologie* **38**, 860-863.